

**KÖRNYEZETI HATÓTÉNYEZŐK ENDOKRIN  
DISZRUPTOR (ED) HATÁSAINAK EXPERIMENTÁLIS  
VIZSGÁLATA ÉS KAPCSOLATA A  
KARDIOVASZKULÁRIS KLINIKAI GYAKORLATTAL**

**Ph.D. értekezés**

*dr. Hausinger Péter*

**Témavezető: Dr. habil Gálfi Márta**

**Társtémavezető: Dr. Sepp Krisztián**

**Biológia Doktori Iskola**

**JGYPK & ÁOK**

**Környezettoxikológiai Kutató Műhely**

**SZTE TTIK**

**2021**

**Szeged**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1 Bevezetés .....	6
2 Homeosztatikus Diszruptorok.....	7
2.1 Halogénezett aromás szénhidrogének tulajdonságai és előfordulásuk.....	8
2.1.1 Klórbenzolok .....	8
2.1.2 Fenilkarbamidok.....	9
2.2 Hatótényezők expozíciós szerepének modellezése .....	9
3 A kardiovaszkuláris kórképek és diszruptor hatások vizsgálatának jelentőségét alátámasztó egészségügyi adatok .....	10
3.1 Vazospasztikus angina és epidemiológiája .....	11
3.2 Szinusz Valsalva aneurizmák (SVA) jelentősége és epidemiológiája.....	12
4 Endokrin diszruptorok lehetséges kardiovaszkuláris támadáspontjai .....	13
4.1 Kémiai expozíciók és hormonális mediátorok – a homeosztázisban és a kardiovaszkuláris szabályozásban .....	13
4.1.1 Monoamin mediátorok .....	14
4.1.2 AVP és hálózati kapcsolatai .....	15
4.1.2.1 AVP szerepe agresszióban és szorongásban .....	16
4.1.3 Az OT szerepe és hálózati kapcsolatai.....	17
4.1.4 Az ACTH szerepe és hálózati kapcsolatai .....	18
4.1.5 A prolaktin szerepe és hálózati kapcsolatai .....	19
4.2 Az endokrin diszruptorok hatása az endotél- és vaszkuláris simaizomsejt funkcióra .....	19
4.2.1 Hipokalémia szerepe a vazospazmusban.....	20
4.2.2 Reaktív oxigén gyökök (ROS) és a vazomotor diszfunkciók kapcsolata .....	20
4.2.3 Gyulladásos folyamatok a vazospazmusban .....	22
4.3 Endokrin Diszruptorok hatása az érfal kóros strukturális elváltozásaira .....	23
4.3.1 Reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepe az érfal strukturális zavarában .....	23
4.3.2 Gyulladásos folyamatok szerepe az aneurizmák kialakulásában.....	24
5 Környezeti expozítorok diszrupciós és kardiovaszkuláris hatásai .....	24
5.1 Klórbenzol expozíciók.....	24
5.2 Fenilkarbamid expozíciók.....	27
6 Célkitűzés .....	28
7 Módszerek, anyagok .....	31
7.1 <i>In vivo</i> kutatási protokollok.....	31
7.1.1 Alkalmazott expozíciók és kísérleti csoportok .....	31

7.1.1.1	Kísérleti protokoll.....	31
7.1.1.2	Viselkedés vizsgálatok.....	33
7.1.1.3	Prolaktinomás adenohipofízis in vivo indukciója ösztron-acetát implantációval.....	34
7.2	<i>In vitro</i> vizsgálatok.....	35
7.2.1	Adenohipofízis monolayer sejt kultúrák (AdH).....	35
7.2.2	Neurohipofízis monolayer sejt kultúrák (NH) .....	36
7.2.3	In vitro kísérletek.....	36
7.2.4	NH monoamin indukált exocitózis vizsgálatok.....	37
7.2.5	NH CIB és Uron kezelései .....	38
7.2.6	Hormon mérések.....	38
7.2.6.1	AVP, OT, ACTH és PRL meghatározás felülúszó médiumból .....	38
7.2.6.2	AVP, OT, ACTH és PRL meghatározása plazmából .....	39
7.3	Kísérleti állatok.....	39
7.4	Statisztikai analízis.....	40
7.5	Betegek és alkalmazott klinikai módszerek .....	40
7.5.1	Esettanulmány 1.....	40
7.5.2	Esettanulmány 2.....	41
8	Eredmények .....	42
9	Megbeszélés, következtetések .....	66
10	Köszönetnyilvánítás.....	90
11	Irodalomjegyzék.....	91
12	Összefoglaló .....	105
13	Summary .....	110

## Rövidítések jegyzéke

+B: kortikoszteron	FMN: flavin-adenin mononukleotid
+C: pozitív kontroll	FPN1: ferroportin 1
-C: negatív kontroll	FTH1: ferritin nehéz lánc 1
3,4-DCA: 3,4-diklóranilin	fU: fenilurea
5-HT: szerotonin	GGT: gamma-glutamil-transzpeptidáz
ACh: acetilkolin	GPX4: glutation peroxidáz
AChE: acetilkolin észteráz enzim	GSH: glutation
ACTH: adrenokortikotrop hormon	HCIB: hexaklórbenzol
ADA: aszimmetrikus dimetil-L-arginin	HD: homeosztatisz diszruptorok
AdH: adenohipofízis sejtkultúra	HMT: hipofízis-mellékvesekéreg tengely
AGII: angiotenzinogén II	hsCRP: magas szenzitivitású C-reaktív protein
AhR: aril-szénhidrogén receptor	HTP: humán toxicitási potenciál
AO: aorta gyök	IARC: International Agency for Research on Cancer
Arg transzporter: arginin transzporter	ICAM-1: intercelluláris adhéziós molekula-1
AVP: arginin-vazopresszin	IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$
Bcl-2: B-sejt limfoma protein-2	IL: interleukinok
BH4: tetrahidrobiopterin	IP3: inozitol-3-foszfát
cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát	IP3-R: inozitol-3-foszfát receptor
CAT1: kationos-aminosav-transzport 1 transzporter	IPCS: International Programme on Chemical Safety
cGMP: ciklikus guanin monofoszfát	IR: immunoreaktív
CIB: klórbenzol	KvD: Kardiovaszkuláris Diszruptor
COX-1: ciklooxygenáz-1	KvDV: Kardiovaszkuláris Diszruptor Vegyület
CRH: kortikotrop-releasing hormon	LAD: ramus descendens anterior
CRP: C-reaktív protein	L-arg: L-arginin
CYP450: citokróm P450 mono-oxigenáz	LCX: ramus circumflexus
CSF: cerebrospinális folyadék	LIA: immunokemilumineszcencia
D: diagonális ág	LIP: ideiglenes vas raktár
D1: 0,1 $\mu$ g/testtömeg kg dóziszú mCIB	LMCA: bal koszorúér főtrörzs
D2: 1,0 $\mu$ g/testtömeg kg dóziszú mCIB	LSVA: bal Valsalva tasak aneurizma
DAG: diacil-glicerol	LV: bal kamra NADPH: nikotinamid-adenin-
dCIB: 1,4-diklórbenzol	dinukleotid foszfát redukált formája
DMT1: divalens metál transzporter 1	mCIB: TCIB+HCIB
DU: diuron	MC-R: melanokortin receptor
E <sub>Arg</sub> -áz: argináz enzim	MLC: miozin könnyű lánc
EC mátrix: extracelluláris mátrix	MLCK: miozin könnyűlánc kináz
ED: endokrin diszruptor	MLC-kináz: miozin könnyűlánc kináz
EDHF: endotél eredetű hiperpolarizációs faktorok	MMP: mátrix-metalloproteáz
E <sub>m</sub> : membrán potenciál	MSH: melanocita stimuláló hormon
eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz	MU: monuron
EPM: elevated plus maze teszt	NADP <sup>+</sup> : nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát oxidált formája
ER: ösztrogén receptor	NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát redukált formája
ER $\alpha$ : nukleáris ösztrogén receptor alfa	nED: neuroendokrin diszruptor
ER $\beta$ : nukleáris ösztrogén receptor béta	NH: neurohipofízis
$f(R)Ca^{2+}$ : receptor függő $Ca^{2+}$ csatorna	nNOS: neurális nitrogén monoxid-szintáz
$f(U)Ca^{2+}$ : feszültség függő $Ca^{2+}$ csatorna	NO: nitrogén-monoxid
F: fisztula	NOS: nitrogén-monoxid szintáz
FAD: flavin-adenin dinukleotid	
FFR: frakcionális flow rezerv	

Nrf2: eritroid 2 eredetű nukleáris faktor	RDA: ramus descendens anterior
NSTEMI: non-ST elevációs miokardiális infarktus	RI: resident intruder teszt
O <sub>2</sub> <sup>•</sup> : szuperoxid gyök	RIA: radioimmunoassay
OCT: optikai koherencia tomográfia	ROCK: RhoA/Rho-kináz útvonal
OF: open field teszt	ROS: reaktív oxigén gyök
OH <sup>•</sup> : hidroxil gyök	SC: stressz kontroll
ONOO <sup>•</sup> : peroxinitrit gyök	SGOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz
OT: oxitocin	SGPT: glutamát-piruvát-transzamináz
OT-R: oxitocin receptor	SON: nucleus supraopticus
ÖTP: ökotoxikológiai potenciál	SR: szarkoplazmás retikulum
p38 MAPK: p38 mitogén aktivált protein kináz	STAT-1: szignál transzducer és transzkripció aktivátor-1
PAP/DAB: 3,3-diaminobenzidin tetra-hidroklorid	SV: véna saphena graft
PCBT: penta-kloro-benzén-tiol	SVA: szinusz Valsalva aneurizma
PCP hidroxiláz: penta-kloro-fenol hidroxiláz	TCBQ reduktáz: tetra-kloro-benzo-kinon reduktáz
PCP: penta-kloro-fenol	TCBQ: tetrakloro-benzo-kinon
PCP-NAC: penta-kloro-n-acetil-cisztein	TCHQ: tetrakloro-hidro-kinon
PGI2: prosztaciklin	TCIB: 1,2,4-triklórbenzol
p-MLC: foszforilált miozin könnyűlánc	TF: transferrin
POP: perzisztens szerves szennyező	TFR1: transferrin 1 receptor
PRL: prolaktin	TGF-β: transzformáló növekedési faktor-β
PRLOMA: prolaktinomás adenohipofízis sejtkultúra	TNF-α: tumornekrózis faktor α
PU: fenuron	ttg kg: testtömeg kilogramm
PV: műbillentyű	VCAM-1: vaszkuláris adhézións molekula-1
PVN: nucleus paraventricularis	VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
R: 7 transzmembrán proteinnel rendelkező G fehérjéhez kapcsolt monoamin receptor	

## 1 Bevezetés

A XX. század utolsó két évtizedében már erőteljes és igen széles spektrumú környezeti terhelések [1] jelentek meg a Föld szinte minden régiójában, azaz minden környezeti elem vonatkozásában (víz, levegő, talaj), amelyek szükségszerűen generáltak a szupra- és infraorganizmus szintű élő rendszerekben környezettoxikológiai folyamatokat [2]. Napjainkra ez a tendencia annyira fokozódott, hogy a kialakult expozíciókat már kóroki hatótényezőkként [3] sem hagyhatjuk figyelmen kívül. A humán betegségek sikeres diagnosztikájához és hatékony gyógyításához fontos, hogy az adott környezeti hatótényezők kiváltotta biológiai mechanizmusokat megismerjük. Ezért napjaink sürgető kihívásává vált a klinikai gyakorlatban a környezeti hatótényezők okozta általános biológiai mechanizmusok feltárása. Mindehhez nagy segítséget jelenthetnek az experimentális állatkísérletes kutatások. A környezettoxikológiai események mechanizmus szintű feltárásával a hatótényezők (expozitorok) egyes csoportjain (fizikai, kémiai, biológiai) belül azokat az általános ok-okozati folyamatokat kell megtalálnunk, amelyek lehetőséget biztosítanak a humán relációjú extrapolációkra. Ilyen kontextusban a különböző szerveződési szinteken zajló kísérletes munkák eredményei rávilágíthatnak a polietiológiás betegségek megjelenésének környezeti kockázataira és azok kezeléséhez adhatnak további támpontokat.

A társadalmak jelenlétével a biológiai organizmusok és így az ember számára is a szükséges életfeltétel megváltozott, ami az élő rendszerek fiziológiai folyamatainak állandó iteráló átalakítását igényli a permanensen változó környezeti feltételekhez. Ez az organizmusok folyamatos életfeltétel változásokra adott válasza: az alkalmazkodás folyamata. Következésképpen, az ember esetén megjelenő alkalmazkodási mintázatok függenek az expozíciók mértékétől, azok kombinációjától és hatásidejétől is, ami hozzájárulhat az egészségparaméterek romlásához. Ezért szükségszerű napjainkban a környezettoxikológiai közelítések megjelenítése a gyógyítás gyakorlatában (pl. diagnosztikus és/vagy kezelési protokollok), amihez számos adatot szolgáltatnak az experimentális tapasztalatok.

Ismert, hogy az emberi szervezet strukturális felépítése egy komplex, párhuzamos működésű, dinamikus, nyílt rendszerként értelmezhető, amely a környezetével kötelezően anyag, energia és információs kapcsolatot tart fenn, annak érdekében, hogy optimalizált életjelenségei működjenek [4,5]. Ehhez az egészséges emberben, komplex homeosztatikus működéseket generálnak a környezetből származó bementi jelek.

Tudott, hogy az életjelenségek fenntartása számos összetett, rendszerműködési (táplálkozás, anyagszállítás, kiválasztás stb.) aktivitással valósul meg [6,7,8], amelyeket egyértelműen a feltételekből (környezet) származó bemeneti jelek determinálnak. *Egyszerűen fogalmazva: egészséges életműködésünk alapja a természetes evolúciós adaptációval „megismert” környezetben optimalizáltan működni képes egészséges emberi szervezet.* Mivel a környezeti feltételek megváltozása a bemeneti jelek módosulását eredményezi, ezért ez a változás az emberi szervezetben eltérő rendszerhálózati válaszokat, sokszor zavarokat generál. A morfológiai eltéréseket még nem mutató (funkcionális) zavarokat a környezettudomány „kiszavar”-ként definiálja, melyek kezdetben reverzibilis tartománnyal indulnak, a folyamat előrehaladtával azonban irreverzibilissé válnak. Amennyiben a zavar háttérében morfológiai eltérés is kimutatható, úgy az környezettudományos szempontból „strukturális zavar”-ként definiált, mely mindig irreverzibilisnek tekinthető. Az említett zavarok az emberi szervezetben olyan változásokat eredményezhetnek, amelyek akut [9,10] és/vagy krónikus [11,12] betegségekhez vezetnek. Az ovostudomány minden tevékenységével az emberi szervezet rendszerhálózatának optimális működésfenntartását célozza. Ennek megvalósításában döntő szerepe van a környezeti feltételek megismerésének, amelyek rendszerzavarok (betegségek) esetén még inkább meghatározzák az orvosi beavatkozásokat, pl. a terápiás lehetőségeket. Ilyen összefüggésben a kórelőzmények különösen hangsúlyossá válnak a klinikumban, ugyanis a beavatkozások minőségét már ezek is determinálhatják.

Az emberi szervezet komplex biológiai rendszer, amely a bemeneti jelfogó és továbbító elemeivel (pl. kültakaró, gasztrointesztinális rendszer egyes részei, stb.), valamint az anyag/energia/információ átalakító (pl. a mozgás szervrendszere) és transzportáló (pl. szív-érrendszer, légzési szervrendszer, kiválasztó szervrendszer, stb.) alrendszereivel, továbbá az optimalizáló funkciókért felelős strukturák (pszicho-neuroendokrin-immunrendszer) kooperatív működésével biztosítja a homeosztázist [13,14].

## **2 Homeosztatis Disruptorok**

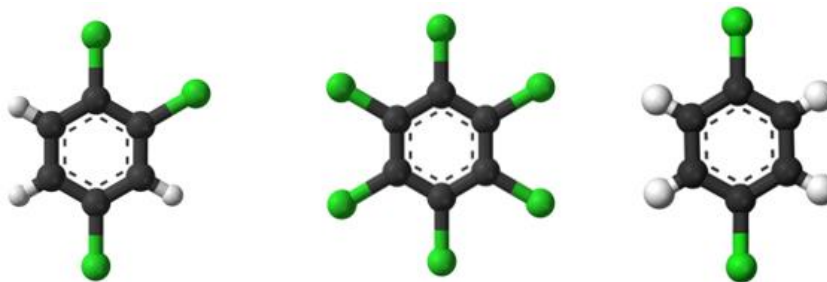
A környezeti kapcsolatokkal működésben tartott emberi szervezet expozícióba kerülhet olyan hatótényezőkkel, amelyek a szervezet alrendszereit megzavarhatják, ezeket *disruptor* hatásoknak nevezzük, amelyeken belül megkülönböztetünk közvetlen és közvetett disruptor hatásokat [15,16,17].

A fizikai (pl. elektromágneses tér -, akut erőhatások-, nyomás-, áramlási tényezők változása stb.), és/vagy kémiai (pl. halogénezett szénhidrogének stb.), és/vagy biológiai hatótényezők azonosításakor, azok hatáseredményeit a nemzetközi szabványkövetelmények szerint [18], de az orvosi gyakorlatnak is megfelelően, a humán toxicitási potenciál (HTP) megjelenítésével is jellemzik. Ennek bevezetése azért is fontos, mert szabványos megközelítésben a világon észlelhető környezeti hatások összehasonlíthatósága vagy a következmények elhárítását célzó beavatkozások eredményessége, valamint a terápiás megoldások javítása standardizálhatóvá válik.

A kémiai környezeti hatótényezők közül a figyelem fókuszában vannak a halogénezett/aromás/heteroatomos szénhidrogének, mert a társadalmi tevékenységek által globális elterjedésűek a Földön [15,19]. Lipofilitásuk és perzisztenciájuk révén napjainkra a teljes táplálékláncban előfordulnak, ami súlyos következményekkel jár. Az organizmusok lipid fázisaiban feldúsuló perzisztens szerves szennyezők (POP) az utódgenerációkban is jelen vannak, amelyek az embriogenezis, az ontogenezis [20] folyamatait megzavarják. Ismert, hogy pl. klórbenzolok (ClB) táplálékaink (sajtok, húsok, stb.) lipofil fázisaiban jelen vannak [21], (pl. Kanadában a kereskedelmi forgalomban kapható tojásban: 0,17 µg/kg nedves tömeg, a 2 %-os tejben: 0,16 µg/kg nedves tömeg; a hamburgerben: 0,39 µg/kg nedves tömeg átlagos klórbenzol tartalmat detektáltak [22]). De alacsony hidrophil oldékonyságuk ellenére az ivóvízből [23] is kimutathatók. Mindez igazolja, hogy a társadalomban élő humán populációk biztosan érintettek a halogénezett/aromás szénhidrogén expozíciókban, amelyek közül a klórbenzolok expozíciós útvonalai a táplálkozással, aspirációval és a bőrön keresztül valósulnak meg elsősorban [24,25,26].

## 2.1 Halogénezett aromás szénhidrogének tulajdonságai és előfordulásuk

### 2.1.1 Klórbenzolok

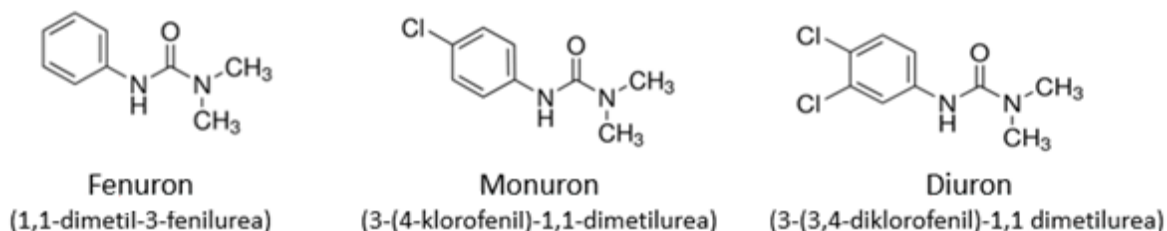


**1. ábra** 1,2,4-Triklórbenzol (TCIB), Hexaklórbenzol (HCIB), 1,4-Diklórbenzol (dCIB)



A POP vegyületek közé sorolt klórbenzolok több klórszubsztituált vegyületet képviselnek. Igen sok szempontból kutatott a hexaklórbenzol (HCIB) (1. ábra), amely fehér, kristályos anyag. Már 1933 óta fungicidként, később az alumínium- és festékiparban, a pirotechnikában, építő- és bútoripari konzerválásban alkalmazták. Napjainkban a fejlődő államokban még használják segédanyagként a klórtartalmú oldószerek és peszticidek gyártásához [27,28]. A vázolt széleskörű használat az oka a globális elterjedésének és expozíciós szerepének. A triklórbenzol (TCIB) (1. ábra) stabil, nem reaktív, jellegzetes szagú, szerves oldószerekben oldódó, szintelen folyadék vagy szilárd halmazállapotú vegyület. A TCIB izomerek közül az 1,2,4-triklórbenzol egyes kémiai folyamatok intermediere és inszekticidként, fafelületkonzerválóként, festékalálékként, hőcserélőként, szintetikus olajokban és szigetelőanyagként széleskörben használt [29,30,31]. A diklór-benzolok klórszubsztitúciójuk szerint meta- (1,2-diklór), orto- (1,3-diklór) és para- (1,4-diklór) helyzetű izomereket jelentenek. Lipofil, alacsony vízdékonyságú, szintelen vagy fehér kristályos szerkezetűek, amely oxidáló szerekkel reagál. Inszekticidekben, dezodorokban, festékekben használt, toxikus anyag. Az ökotoxikológiai potenciál (ÖTP) és a HTP nemzetközi standard vegyülete az 1,4-para-diklórbenzol.

### 2.1.2 Fenilkarbamidok



**2. ábra**

Jól ismert gyomirtók a fenilkarbamid vegyületek közül a fenuron (PU), monuron (MU) és diuron (DU). Nehezen bomló ágensek, ezért a talaj- és felszín alatti vizekben megjelennek. Aromás gyűrűhöz kapcsolódó karbamid oldalláncuk van, klóratomszámuk szerint homológ sort képeznek (2. ábra). A PU (amely nem halogénezett) az említett három fenilkarbamid vegyület közül a leginkább perzisztens [32].

## 2.2 Hatótényezők expozíciós szerepének modellezése

A nevezett hatótényezők expozícióinak tanulmányozásában a standardizálásnál a domináns expozíciós útvonalat, a gasztrointesztinális bejuttatást, mint reális expozíciót

értelmes modellezni. Ehhez experimentális modellvizsgálatokkal standardizálttá kell tenni az expozíciós útvonalat; a hatás értelmezés biztonsága és a szabványos követelményeknek való megfelelés [33] teljesülése okán. Környezettoxikológiai munkacsoportunk több mint 20 éve tematikus vizsgálatokkal tanulmányozza biológiai rendszerekben a CIB-ok hálózati hatásait.

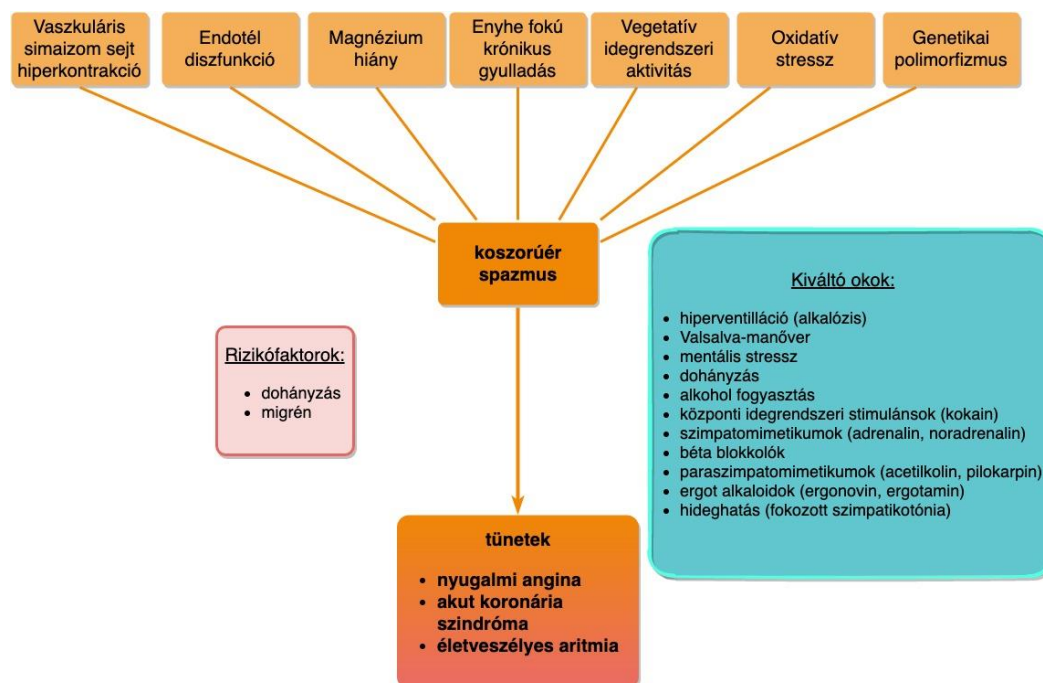
Igazoltta vált, hogy a hatótényezők által a kiváltott endokrin diszruptor (ED) hatásokkal a homeosztatikus szabályozás is tanulmányozható, az integrált hálózati kapcsolatok révén, ugyanis ilyen módon a neuro-endokrin-immuno-pszicho folyamatok követésére nyílik lehetőség [34,35]. Ennek megfelelően az endokrin és neuronális rendszerkapcsolatok közös szabályozási cikluszűködésben tanulmányozhatók. Indikátorként celluláris funkciót, pl. az aktív hormon exocitózist (pl. arginin-vazopresszin /AVP/), oxitocin /OT/, adrenokortikotrop hormon /ACTH/, prolaktin /PRL/) választva, jól követhetők a szabályozási ciklusok [36,37,38], amelyeknél fontos szempont, hogy azonosíthatóvá váljanak a humán vonatkozásokkal összefűgűő párhuzamosságok is. Ilyen kapcsolati lehetőségeket kínál a komplex homeosztatikus szabályozásban, a monoaminerg pályarendszerek vegetatív funkciókkal, pl. a kardiovaszkuláris regulációval képzett hálózati kapcsolata. Amennyiben a hatótényező rendszerzavart generál, ez közvetetten hat a perifériás fiziológiai folyamatokra. Ugyanakkor a hatótényező jellegétől függően közvetlenül is befolyásolhatja a periférián a vegetatív funkciókat. Ezek a közvetlen hatások, a szervezet effektorális rendszerében, a celluláris mechanizmusokban is realizálódnak. Ilyen kontextusban a különféle betegségeket okozó expozíciók által megzavart generális mechanizmusok konkrét szervrendszerek működészavarában jelentkeznek [39]. Jelen munkában a kardiovaszkuláris zavarok és környezeti hatótényezők kapcsolatát keressük, olyan mechanizmus szintű párhuzamosságok feltárásával, amelyeket állatkísérletes experimentális munkáinkkal alapozunk meg.

### **3 A kardiovaszkuláris kórképek és diszruptor hatások vizsgálatának jelentőségét alátámasztó egészségügyi adatok**

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. Becslések szerint 2017-ben bekövetkezett 55 millió haláleset közül mintegy 17,8 millió volt visszavezethető szív és érrendszeri okokra [40,41]. Magyarországon 2012-ben 100.000 lakosra vetítve 779 kardiovaszkuláris halálozás jutott, amellyel sajnos hazánk a kardiovaszkuláris mortalitást vezető országok közé tartozik [42,43].

### 3.1 Vazospasztikus angina és epidemiológiája

A klinikai gyakorlatban, mind differenciál diagnosztikai, mind pedig terápiás szempontból különös jelentőséget kap a vazospasztikus angina, amely az epikardiális koronariás erek tranziens és visszatérő vazospazmusával jár. Ez átmeneti transzmuralis miokardialis iszkémiához, súlyos esetben miokardiális infarktushoz vezethet [44,45]. A vazospasztikus angina felismerése, megfelelő kezelése és a megelőzése tehát, nagy klinikai jelentőséggel bír. A kórképet először Prinzmetal és mtsai írák le 1959-ben, mely miatt a szakirodalom a klinikai jelenséget Prinzmetal anginának is említi [46]. A vazospasztikus anginában szenvedők nagy részében az elérhető orvosi képalkotó eljárásokkal (angiográfia, intravaszkuláris képalkotók) nem igazolható strukturális eltérés (ateroszklerotikus szűkület) [47]. Ez is az oka, hogy a koronária spazmus intenzíven kutatott terület, de napjainkra komplex celluláris folyamatai csak részben tisztázottak. Igazolt, hogy a fiziológiás vazomotor reakciókat a neurális és humorális (endokrin és parakrin) tényezők biztosítják, amelynek feltétele az ép endotélfunkció [48]. Ezen tényezők komplex összhangjának sérülése a vazodilatátor és vazokonstriktor mechanizmusok egyensúlyának megbomlásához vezet, amelynek következtében vazokonstriktor hatások jutnak domináló szerephez (3. ábra).



3. ábra A koszorúér spazmus patofiziológiája, rizikó faktorai és kiváltó tényezői [49]

A kardiovaszkuláris mortalitás több mint 50%-áért a koszorúér betegségek felelősek [50]. A koszorúérbetegségek csoportjába sorolt vazospasztikus angina jelentősen alul diagnosztizált, ezért pontos incidenciája nem ismert. Koszorúerspasmus prevalenciáját vizsgáló tanulmány szerint az angiográfiásan ép koszorúerekkel rendelkező, de anginázó betegek 62%-ában mutatható ki koszorúerspasmus [51]. A vazospasztikus angina háromszor gyakrabban fordul elő az ázsiai populációban, mint a kaukázusiakban [52,53]. Koszorúér elzáródással nem járó miokardiális infarktusban szenvedő olasz betegek 45%-ban [54], francia betegek 16%-ban [55], német betegek 49%-ában [56], míg a japán betegek 78%-ban volt kimutatható koszorúér spasmus [57]. A populációs különbségek ellenére az európai adatok szerint a kaukázusi mortalitási statisztikák az ázsiai populációhoz viszonyítva rosszabbak. Amíg Koreában és Japánban a vazospasztikus angina 3-éves szívinfarktus mortalitása 2-3% [58,59], addig a nyugati civilizációban ugyanez 11% [60,61].

### 3.2 Szinusz Valsalva aneurizmák (SVA) jelentősége és epidemiológiája

Az ütőerek falának veleszületett (kötőszöveti betegségek) vagy szerzett gyengesége (gyulladás, trauma, ateroszklerózis) az artériák fokális tágulatával járó betegségekhez, aneurizmák kialakulásához vezethetnek. Ezek megjelenése polietiológiás, de ma még a pontos patomechanizmusa az intenzív kutatás ellenére sem tisztázott. Ismert, hogy a dohányzás egyes anatómiai lokalizációban kialakuló (aorta, cerebrális ütőerek) aneurizmák elsőszámú rizikófaktorának tekinthető [62,63], egyéb lokalizációban (visceralis erek, koronáriák) pedig potenciális rizikófaktoraként szerepel [64].

A szervezetben az aneurizmák bárhol előfordulhatnak, de leggyakrabban az aortát, a cerebrális artériákat, koronáriákat és a visceralis artériákat érintik. Az esetek egy részében tünetmentesek és véletlen, egyéb céllal végzett vizsgálatok során kerülnek felismerésre. Gyakran azonban életet veszélyeztető ruptúrával vagy általuk okozott kompressziós tünetekkel hívják fel magukra a figyelmet.

Az USA-ban évente 13.000 ember hal meg aorta aneurizmában, mellyel az aorta aneurizma (hasi + mellkasi) a 15.-19. leggyakoribb halálok [65]. Évente 10 mellkasi aorta aneurizmás esetet diagnosztizálnak 100.000 lakosra vetítve, de az incidencia folyamatosan emelkedik a populáció előregedésének és a fejlődő diagnosztikai képalkotó eszközöknek köszönhetően [66]. A mellkasi aorta aneurizma többnyire az aortagyököt és az aorta felszálló szakaszát érinti [67]. A Valsalva tasakokból kiinduló aneurizmák az

aorta gyöki aneurizmák ritka formái, melyek pontos incidenciája és prevalenciája nem ismert. *Post mortem* vizsgálatok alapján a populáció 0,09%-át érinti [68]. A betegek 80%-a férfi és bármely életkorban előfordulhat. Az ázsiai populációban ötször gyakrabban fordul elő, mint a kaukázusiakban [69]. Ruptúrált kezeletlen SVA átlagos túlélése 1-3,9 év [70]. Non-infect esetben a műtéti mortalitás 1%, ami 97%-ban 5-10-éves túlélést jelent [69] azonban megelőző szepszis esetén a mortalitás akár 80%-ot is elérheti [71].

Mivel a polietiológiás kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához vezető mechanizmusok csak részben ismertek, a kialakulásukban szerepet játszó környezeti hatások sem kellően feltártak. Ugyan a kardiovaszkuláris betegségek (vazospasztikus angina, torakális aorta aneurizmák) ellátásánál a klinikai gyakorlatot támogató európai ajánlás megemlíti a környezeti hatások közül a levegőterhelést, de további kontextusokra nem tér ki. A szakirodalom sem dolgozza fel a kardiovaszkuláris eseményekre fókuszáltan a nagy expozíciós hatótényező csoportokat. Noha, az európai ajánlás a diagnosztizálásnál figyelemmel van a dohányzásra, mint környezeti kémiai terhelésre. Az amerikai ajánlás nem tér ki a környezeti kémiai expozíciókra, noha a dohányzást, droghasználatot stb. érinti, mint a kardiovaszkuláris célterület hatótényezőit [44,45].

A vázoltak alátámasztják a kardiovaszkuláris betegségekkel kapcsolatos, környezettoxikológiai összefüggések tanulmányozásának indokoltságát.

## **4 Endokrin diszruptorok lehetséges kardiovaszkuláris támadáspontjai**

A kardiovaszkuláris folyamatok homeosztatikus diszruptor hatások következtében számos funkcionális (pl. vazodilatációs és vazokonstriktív eltérésekkel) és strukturális (pl. aneurizmákat generáló) zavarral jelenhetnek meg, amelynek hátterében neurális/humorális/endotél funkciót/érfalstuktúrát érintő valamely szervezeten belüli, endogén (pl. közvetett ED hatás) vagy szervezeten kívüli, exogén (pl. halogénezett szénhidrogén) stresszor módosító hatása oki tényezőként feltételezhető.

### **4.1 Kémiai expozíciók és hormonális mediátorok – a homeosztázisban és a kardiovaszkuláris szabályozásban**

A környezeti hatótényezők a központi idegrendszer mediátoraival szabályozott (stressz) hormonokkal, (pl. AVP, OT) és/vagy monoaminokkal közvetlen és közvetett hatásokat váltanak ki a szív-érrendszer működésében [72].

#### 4.1.1 Monoamin mediátorok

Az idegrendszeri monoamin mediátorok kardiovaszkuláris szerepe domináns, amelyet a katekolamin pl. noradrenalin (NA) neurotranszmitterként és hormonként is közvetít. A szintén monoamin szerotonin (5-HT), általános agyi neurotranszmitter és jelentős szerepe van a vegetatív funkciók szabályozásában (cirkadián ritmus, alvás-ébrenlét, táplálkozás, testsúly, kardiovaszkuláris szabályozás, hőszabályozás) [38]. Ugyanakkor, a hangulati élet fenntartásában: szorongás, depresszió, és a viselkedés mintázatok (szociális, szexuális, táplálkozási viselkedés) kialakulásában, továbbá az impulzus kontrollban (agresszió) is döntő szerepű [73]. Ilyen módon az 5-HT mediált szabályozások komplex hálózati csomópontokként értelmezhetők az emberi szervezetben [74]. Az 5-HT perifériáson a trombocitákban, az erek falában, a szívben, a gasztrointesztinális rendszer enterokromaffin sejtjeiben, a simaizomsejtekben és a tüdőben is regulátor [75] szereppel bír. Az intravazális trombusból parakrin úton felszabaduló 5-HT közvetlenül endotél vagy közvetett vaszkuláris simaizomsejt hatás révén mediálhat vazokonstriktív mechanizmusokat [76,77]. Anatómiai lokalizációtól függően az 5-HT-ra adott kontraktilis válasz szerint az erek simaizomsejtjeinek 5-HT szenzitivitása jelentős különbségeket mutat (legérzékenyebbek a cerebrális- valamint a szív koszorúerei) [78].

A homeosztatikus komplexitás részeként neuroendokrin elemnek is tekinthető az 5-HT, mert receptorainak jelenléte igazolt a nucleus paraventricularis (PVN)-ban és a nucleus supraopticus (SON)-ban, amely magok az AVP és OT szintézis központjai. Ez megmagyarázza a PVN-ban a centrális 5-HT kezelés AVP felszabadulást eredményező hatását [75].

A NA a szimpatikus idegrendszer elsődleges neurotranszmittere, ugyanakkor a periférián is jelen van. A neuroendokrin hatást a hipotalamusz SON és PVN neuronjain található noradrenerg receptorokon keresztül érvényesíti, ahol serkentik az OT és az AVP szekréciót [79,80]. A NA AVP által közvetített hatásai a  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  ( $V_3$ ) és  $V_2$  receptorok által mediáltak [81]. Jelentős a NA szerepe az alvás-ébrenléti ciklusban, az arousal szintjének meghatározásában, az éberségben, a menekülési és megküzdési reakciókban, az izgatottságban, a szorongásban, a depresszióban, az agresszív viselkedésben [73,82,83]. A perifériás NA a szimpatikus innervációnak megfelelően fejti ki hatását a szimpatikus ganglionokban, a kardiovaszkuláris, a respiratórikus, a gasztrointesztinális, az urogenitális rendszer simaizom elemein és a pupillomotoros rostokon [84].



A kardiovaszkuláris rendszerben a legtöbb adrenoceptor típus jelenlétét igazolták: előfordulnak a szívizomsejteken, az érfal simaizom-, endotél- sőt adventiciális sejtjein [85]. Az artériák és vénák simaizomsejtjein az  $\alpha_1$  receptorokon keresztül a NA már alacsony dózisban generalizált vazokonstriktációt eredményez. Ugyan a koszorúereken a  $\beta_2$  receptorok - amelyek a vazodilatációért felelnek -, vannak többségben, de a NA alacsony receptor affinitása révén csak nagy dózisban okoz koronária dilatációt. Az erek endotélsejtjein igazolt az  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  és  $\beta_3$  receptorok jelenléte, amelyek stimulációja nitrogén-monoxid (NO) szintézisének keresztül csökkenti az erek  $\alpha_1$  receptor stimulációra adott vazokonstriktív válaszát [86,87].

A NA nagy affinitással kötődik az  $\alpha$ -receptorokhoz, valamint a  $\beta_1$  receptorhoz és gyenge affinitással a  $\beta_2$  receptorokhoz [88,89]. Igazolt továbbá, hogy kardiomiocitákban a  $\beta_1$  receptorok stimulációja apoptotikus, a  $\beta_2$  receptorok stimulációja antiapoptotikus hatású [90].

#### 4.1.2 AVP és hálózati kapcsolatai

Az AVP esszenciális szerepű a perifériás homeosztatikus funkciók pl. ozmoreguláció, térfogatszabályozás, testhőmérséklet, kardiovaszkuláris szabályozásban [91]. Az AVP felszabadulás domináns kiváltó ingere a hiperozmolaritás, a hipovolémia és a stressz [92].

Az AVP perifériás, antidiuretikus hatását a vese gyűjtőcsatornáinak  $V_2$  receptora [93], kardiovaszkuláris hatását a szívizomsejteken, simaizom- és endotél sejtjeiken található  $V_1$  és OT receptorok közvetítik [91]. Ismert, hogy a perifériás AVP szintézis a szívizomban is jelen van, amely így parakrin úton hozzájárul a kardiovaszkuláris hatásához [94]. Fiziológiai körülmények között termelődő AVP kardiovaszkuláris hatása nem számottevő, patológiai viszonyok között (súlyos vérvesztés, szепtikus sokk) viszont érvényre juthat [95]. Az AVP ereken kifejtett vazokonstriktós hatása négy mechanizmuson keresztül szabályozott: (1) a  $V_1$  receptoron keresztül; (2) a  $K^+$ -ATP-dependens csatorna gátlásán és a következményes simaizomsejt depolarizációval; (3) a NOS gátlásával; valamint (4) egyéb G-fehérjéhez kapcsolt receptorral rendelkező vazokonstriktorok (noradrenalin, angiotenzin II) hatásának potenciózásával [96]. Paradox módon az AVP vazodilatációs hatást is mediál, amelyet az endoteliális OT receptorok NOS aktivációján keresztül hoz létre [97]. Az erek AVP-re adott vazomotor válasza (vazokonstriktó/vazodilatáció) faj és szövettípus, valamint

koncentráció és időfüggő. Az AVP normoxiás patkány kísérletben a koszorúerek vazokonstriktációját, míg hipoxiás esetben azok vazodilatációját váltotta ki [98].

Az AVP szívizomra kifejtett hatása is kettős (bifázisos), alacsony koncentráció fokozza, magas koncentráció csökkenti a szív kontraktilitását, ezáltal a perctérfogatot [95,99].

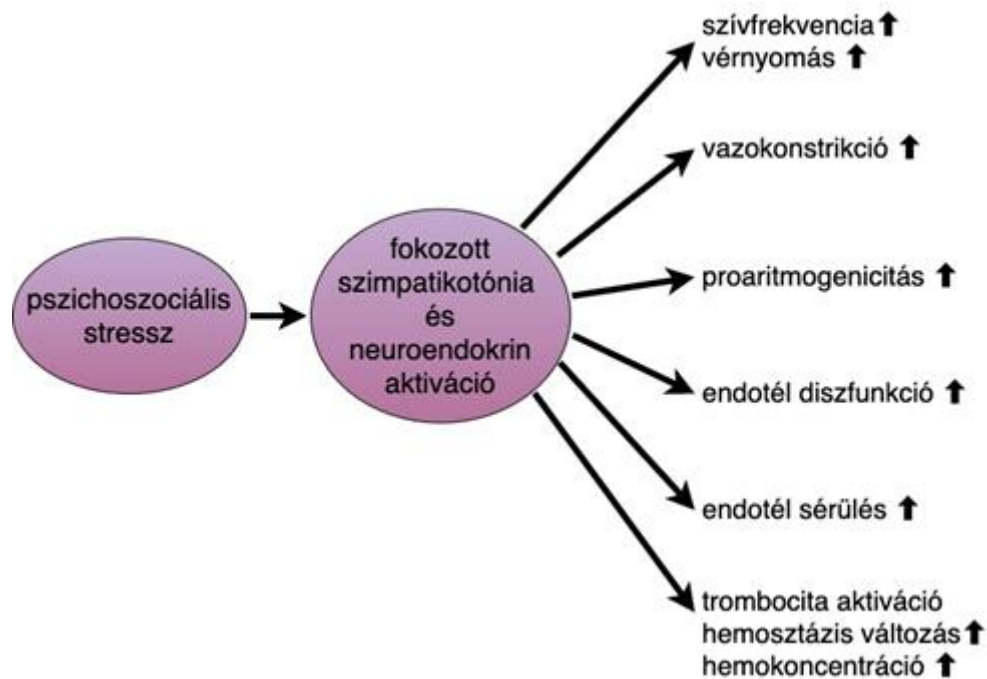
#### 4.1.2.1 AVP szerepe agresszióban és szorongásban

Az AVP a szomatikus hatásain túl jelentős szerepű a viselkedési mintázatokban is. Irodalmi adatok szerint a stresszre adott válaszban, a szorongásos viselkedésben, depresszióban, a tanulásban, az elkerülő magatartásban, a memóriában és a szociális magatartásformákban (paternális viselkedés, szociális felismerés, agresszió, affiliáció, kötődés) [100] igazolt a szerepe. Szorongásban főként  $V_{1a}$  és  $V_{1b}$  receptorok aktiváltak. *In vivo* kutatások alapján ismert, hogy a  $V_1$  receptor antagonisták patkányokban csökkentették a szorongást, amit elevated plus maze (EPM) teszteredmények támasztottak alá. [101]. Igazolt az is, hogy megnövekedett a detektálható AVP szint a plazmában és/vagy a cerebrospinalis folyadékban (CSF) a szorongásos kórképekben [100].  $V_{1b}$ -R knock-out egerekben csökkent agressziót és memóriavesztést írtak le [102]. Továbbá a CSF AVP koncentrációja és személyiségzavaros kórképet mutató betegek agresszív cselekményei között is kapcsolatot mutattak ki, ami összefüggésben volt az 5-HT-erg aktivitás emelkedésével [103]. Megnövekedett AVP-erg neuronszám volt az anterior hipotalamuszban azoknál a kísérleti állatoknál, amelyek ismeretlen fajtársakkal fokozott agressziót prezentáltak [104]. Ugyanakkor  $V_{1b}$ -R knock-out egerek ilyen agressziót nem mutattak [105].

A pszichoszociális faktorok koszorúér betegséget provokáló szerepéről egyre több adat ismert. Epidemiológiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a mentális stresszállapotokban (depresszió, szorongás) szenvedő betegeknél magasabb a koszorúér betegség kialakulásának rizikója [106]. Ennek hátterében a kóros viselkedésből (dohányzás, rossz egészségtudat) adódó, valamint a stressz indukálta direkt patofiziológiai mechanizmusok (fokozott szimpatikotónia, neuroendokrin rendszer aktivációja) állhatnak (4. ábra). Depresszióban szenvedő betegekben megfigyelhető a szimpatikus idegrendszer [107] és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg-tengely fokozott működése [108]. Igazolt a mentális stressz ateroszklerózis-indukáló hatása [109], de a krónikus stresszállapotok rontják az endotél-dependens vazomotor választ az ateroszklerózistól függetlenül is. Állatkísérletes tanulmányok, valamint humán eredmények alapján az akut és a krónikus



stressz endotél diszfunkcióhoz [110], valamint trombocita aktivációhoz [111] vezet, amelyeken keresztül vazokonstriktív mechanizmusokat indukál. Tanulmányok beszámolnak depressziós és szorongásos stresszállapotokban koronária spazmusról, illetve vazospasztikus angináról [112], amely miatt a stressz a vazospasztikus angina egyik provokáló tényezőjeként ismert [60]. Egyes tanulmányok alapján a depresszió növeli az aorta aneurizmák előfordulási gyakoriságát is [113,114].



**4. ábra** Pszichoszociális stressz kardiovaszkuláris hatásai [106]

#### 4.1.3 Az OT szerepe és hálózati kapcsolatai

Az OT a központi idegrendszerben főleg a SON-ban és a PVN-ban termelődik. OT-erg pályák haladnak a PVN-ból az agytörzs és a gerincvelő felé. Az OT rendszer elsődlegesen megismert célterülete a női reprodukciós rendszer (uterusz, laktáció) [115]. Ugyanakkor domináns szerepet játszik az autokrin/parakrin OT, a megtermékenyítés, valamint a korai embrionális fejlődés során is [116]. Nonhipertenzív natriuretikus hatású a vesékben, ami ozmoregulációs szerepét magyarázza [117]. Megtalálható még az emberi timuszban és a zsírszövetekben, ahol inzulinszerű hatást okoz [118]. Kimutatott a jelenléte a mellékvese kéreg- és velőállományában is [119]. A humán OT receptor (OT-R) transzmembrán szerkezetű és GTP kötő fehérjéhez kapcsolódik [120,121]. A centrális OT a tanulás és memória gátlásban, a maternális viselkedésben, a lordózis kiváltásban, a táplálkozási viselkedésben, a stressz által kiváltott viselkedésben, valamint a szorongással, agresszióval járó állapotokban kimutatott szerepű [122,123]. Ismert, hogy

az OT csökkenti a szorongást, ezt - EPM tesztben – az intracerebro-ventrikuláris OT kezelésben részesült nőstény patkányokkal igazolták [124]. További egér és patkány kísérletek szerint az akut és krónikus OT kezelés anxiolitikus hatású [125]. Emberben intranazális OT szorongást csökkent [126]. További humán vonatkozásban az OT csökkent amigdala aktivitást okoz, tehát az OT hiány ellenségességhez, félelemhez, affektív állapotok kibillentéséhez, bizalmatlansághoz vezet, ami az agresszió felszínre jutását támogatja [127].

Az OT a központi idegrendszeren kívül, a periférián, pl. a szívben és az erekben is elválasztására kerül. A kardiovaszkuláris rendszerben keletkező OT a vaszkuláris tónus parakrin regulátorának tekinthető [128]. A vaszkuláris simaizomsejteken bizonyították a G-fehérjéhez kapcsolt OT receptorok jelenlétét [129], amelyeken keresztül az OT vazokonstriktív hatását feje ki, amit a  $V_{1A}$  receptorok is mediálnak. Az OT az AVP-nél is hatásosabb vazokonstriktornak bizonyult a méhlepény és a köldökzsinór ereiben [130]. Ugyanakkor, ismert, hogy az endotél sejtek is képesek OT receptorok expressziójára, melyen keresztül az OT - épp ellenkező - vazodilatatív mechanizmusok generálásával van jelen, amiben szerepet játszhat a NO szintézist fokozó hatása [97]. Ez utóbbi miatt egyesek felvetik az OT kardioprotektív szerepét [131].

#### 4.1.4 Az ACTH szerepe és hálózati kapcsolatai

Az AVP részt vesz a hipotalamo-hipofízis-mellékvesekéreg tengely szabályozási ciklusában, fokozza a kortikotrop-releasing hormon (CRH) triggerelte ACTH szekréciót a hipofízis elülső lebenyében (adenohipofízisben) [132]. *In vitro* kísérleti adatok szerint adenohipofízis monolayer sejt kultúrák kontakt AVP kezelésre emelkedett ACTH elválasztással válaszolnak [133].

Az ACTH hatásait melanokortin receptorok (MC-R) mediálják (5 MC-R izoforma ismert, amelyek G fehérje-kapcsolt transzmembrán proteinek). Ligandjai a melanokortinok családjába tartozó ACTH, melanocita stimuláló hormonok (MSH):  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH és  $\gamma$ -MSH, melyek eltérő affinitással kötődnek receptoraikhoz. MC-R-t a központi idegrendszeren kívül a perifériás szervekben (mellékvesekéreg, bőr, gasztrointestinum, pankreasz, vese, szív, tesztisz, ováriumok) is azonosítottak. Az ACTH az endokrin működések szabályozásában az esszenciális szteroid hormon elválasztását a mellékvesekéreg  $MC_2$  receptorain át, a melanocita stimuláló hatását a bőr pigmentsejtjeinek  $MC_1$  receptorain keresztül közvetíti [134]. Bár az ACTH direkt (perifériás) kardiovaszkuláris hatása mindez idáig nem ismert, érdekes tény, hogy a

szívben jelen vannak MC<sub>3</sub> receptorok [135], melyek közel azonos affinitással kötik az összes melanokortint, így az ACTH-t is. A fentiek miatt, az ACTH perifériás kardiális/kardiovaszkuláris hatása nem kizárt, ennek tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel. A központi idegrendszerben az MC<sub>2</sub> receptoron kívül az összes MC receptor típus képviselteti magát [136]. Ismert, hogy a MC<sub>3</sub> és MC<sub>4</sub> receptor agonisták patkányban vérnyomás és szívfrekvencia emelő hatásúak [137]. Ugyan a központi idegrendszer MC receptorai az egyéb melanokortinokhoz képest az ACTH-t alacsonyabb affinitással kötik, de patológiásan magas hormonszintek esetén az ACTH centrális kardiovaszkuláris hatása szerephez juthat. Jobban ismert az ACTH glükokortikoidokkal közvetített kardiovaszkuláris hatása, amelyet direkt az érfalra kifejtett mechanizmussal és indirekt mineralokortikoid-szerű hatásával vált ki. Az ACTH a glükokortikoidokkal befolyásolja a szív kontraktilitását ezáltal a perctérfogatot. A glükokortikoidok a katekolaminok hatásának potencírozásával szintén hozzájárulnak az ACTH kardiovaszkuláris reguláló szerepéhez [138].

#### 4.1.5 A prolaktin szerepe és hálózati kapcsolatai

A PRL peptidhormon, az adenohipofízis laktotrop sejtjei termelik. Igazolt a PRL fundamentális szerepe a laktációban, ami összefüggésbe hozható további OT funkciókkal (tejcsatorna simaizomkontrakció). A PRL hatást fejt ki a vaszkuláris simaizomsejteken is, a 16 kDa N-terminális fragmentje bizonyítottan gátolja a koszorúerek relaxációját [139]. Ugyanakkor, a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) és  $\beta_2$ -adrenerg mechanizmus gátlásán keresztül vazokonstriktiót okoz [140]. A PRL vazotónust szabályozó hatása endotél-dependens [141]. A PRL az agyalapi mirigyen kívül a hipotalamusz egyes magcsoportjaiban is expresszálódik, ez a centrális eredetű PRL valószínűsíthetően neurotranszmitterként, neuromodulátorként, centrális citokinként, szabályozó vaszkuláris növekedési faktorként funkcionál [142].

## 4.2 Az endokrin diszruptorok hatása az endotél- és vaszkuláris simaizomsejt funkcióra

A szervezet érhálózatában az endotél funkcionális egységet képez az érfal szomszédos simaizomsejtjeivel, vazokonstriktor és vazodilatátor parakrin mediátoraival. Ezen lokális regulációs mechanizmus teszi lehetővé az érrendszer különböző szakaszainak differenciált vazomotor szabályozását.

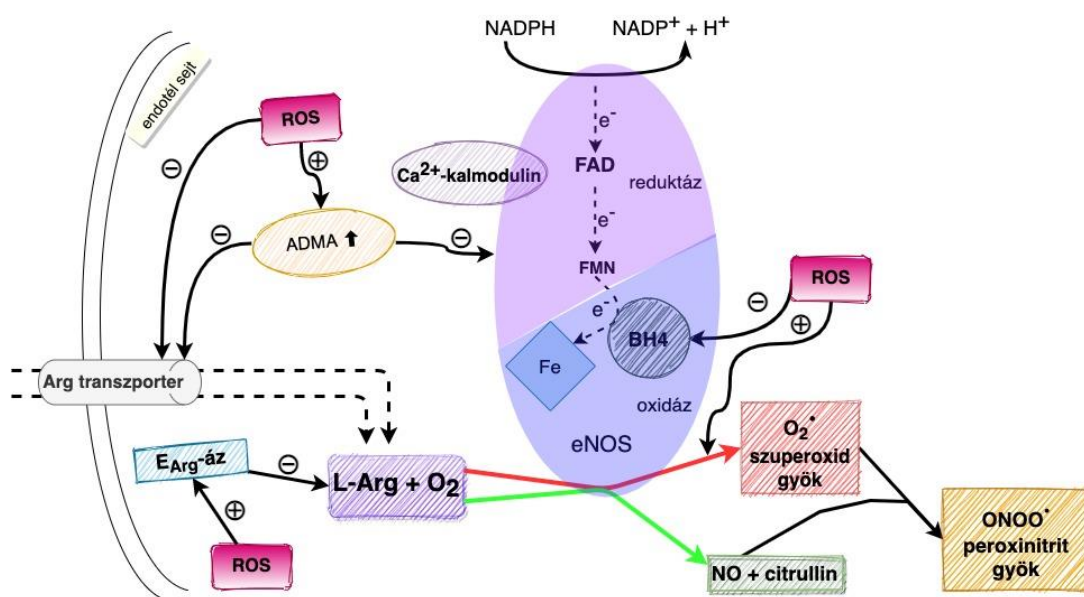
#### 4.2.1 Hipokalémia szerepe a vazospazmusban

A homeosztatisz diszruptor (HD) ezen belül az ED tulajdonságú vegyületek akár közvetlen, vagy közvetett hatásuk révén endotél diszfunkcióhoz vezethetnek. A közvetett hatások esetén az izoionia lokális zavara jellemzően megjelenhet (pl. toxikológiai folyamatok kapcsán kialakuló hányás, hasmenés okán) [143]. Amennyiben a közvetett környezeti hatások az extracelluláris ionmilieu-t érintik [144], ott vazokonstriktív válaszok kiváltásában játszhatnak szerepet, pl. a membránpotenciál meghatározásában esszenciális szerepű  $[K^+]$  változás kapcsán. A patológiás mértékű és időtartamú vazokonstriktív események életet veszélyeztető cerebrális vagy miokardiális iszkémiához vezethetnek [145], ezért is lehet jelentős a közvetett környezeti tényezők vazokonstriktív hatásának tanulmányozása. Irodalomból ismert, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek hiperpolarizációja relaxációt, depolarizációja vazokonstriktiót okoz [146]. Továbbá a simaizomsejtekkel funkcionális egységet képző endotél sejtek parakrin vazokonstriktor (endotelin, angiotenzin-II) vagy vazodilatátor mediátorok (prosztaciklinek, NO) expresszióinak módosításával reagálnak a membránpotenciál változásra. Az endotél eredetű vazodilatátor mediátorok egyik csoportja pl. az endotél eredetű hiperpolarizációs faktorok (EDHF), amelyek a simaizomsejt hiperpolarizációjával szabályozzák a vazotónust. Az említett mechanizmusokban az extracelluláris  $[K^+]$ -nak, valamint az endotél és simaizomsejt membrán  $K^+$ -csatornáinak bizonyított szerepe van [147]. A XX. században ismerték fel, hogy a lokális  $[K^+]$  csökkenés vazokonstriktiót, az emelkedés pedig vazodilatációt [148] eredményez. Igazolt továbbá, hogy a cerebrális erekben az alacsony  $[K^+]$  tranziens vazokonstriktiót, majd kompenzatórikus vazodilatációt vált ki, míg az extracelluláris  $[Mg^{2+}]$  csökkenés vazokonstriktiót, a növekedés pedig vazodilatációt okoz [149]. Állatkísérletes megfigyelések alapján az emelkedett extracelluláris  $[K^+]$  a befeléírányuló egyenirányító  $K^+$ -csatornák és Na/K-ATPáz stimulációján keresztül hiperpolarizációt és következményesen koszorúér relaxációt okoz [150]. A környezeti hatótényezzőként említett dohányzás csökkenti a koszorúerek emelkedett  $[K^+]$ -ra adott relaxációs válaszát [151].

#### 4.2.2 Reaktív oxigén gyökök (ROS) és a vazomotor diszfunkciók kapcsolata

A diszruptor ágensek kiváltotta reaktív oxigén gyökök (ROS) megjelenése központi szerepű a vazomotor diszfunkciók kialakulásában. Bizonyított, hogy a ROS csökkenti a NO biológiai hozzáférhetőségét (aktivitását) az endotéliumban, mely

vazokonstriktív zavarokban nyilvánulhat meg [152]. A NO L-argininből szintetizálódik, a folyamatot az endoteliális-nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) katalizálja [153]. Ezen enzimkomplex egy oxidoreduktáz, melynek oxidáló domainjében kofaktorként tetrahydro-biopterin (BH4) és HEM, redukáló domainjében flavin-adenin dinukleotid (FAD), flavin-adenin-mononukleotid (FMN) és  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin van jelen, mely utóbbi a redukáló egységben gyorsítja az elektronsorgást. Ismert, hogy az oxidatív stressz az L-arginin metabolizmus modulálásával hozzájárul a NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenéséhez, azáltal, hogy a RhoA/Rho-kináz útvonalon keresztül indukálja az L-arginin intracelluláris lebontásáért felelős argináz enzimet valamint direkt módon gátolja az L-arginin celluláris felvételéért felelős kationos-aminosav-transzport-1 (CAT1) transzportert [154]. Továbbá bizonyított, hogy a ROS a BH4 oxidációjával és következményes depléciójával direkt módon gátolja a NO bioszintézisét [155], valamint hozzájárul az eNOS „un-coupling” jelenséghez, mely során az enzim a NO produkció helyett szuperoxid gyök keletkezéséért lesz felelős [152]. Ismert, hogy a ROS fokozza az eNOS endogén inhibitorának, az aszimmetrikus dimetil-L-arginin (ADMA) expresszióját és gátolja az eNOS aktivációjához szükséges poszt-transzkripcióos enzim foszforilációt [156]. A NO biológiai hozzáférhetőségének rapid csökkenéséhez vezet a szintetizált NO oxidatív inaktivációja, mely során az NO-ból szuperoxid gyök hatására ugyancsak reaktív peroxinitrit-gyök ( $\bullet\text{ONOO}^-$ ) keletkezik [152]. Ez a peroxinitrit és ADMA a CAT1 transzporter gátlásával csökkenti a NO bioszintéziséhez esszenciális L-arginin celluláris felvételét [157] (5. ábra).



**5. ábra** A reaktív oxigén gyökök hatása a nitrogén-monoxid szintézisére

Az endotél sejtekben L-argininből eNOS katalízissal NO szintetizálódik. Az eNOS enzim két monomer alegységből felépülő homodimer, melynek C-terminális része reduktáz, N-terminális része oxidáz funkciójú. Az elektronokat a NADPH szolgáltatja, az eNOS reduktáz domainje FAD és FMN kofaktorain át az oxidáz domain Hem Fe-ionjára a BH<sub>4</sub> kofaktor jelenlétében. A végső elektron akceptor a molekuláris oxigén. BH<sub>4</sub> hiányában a monomerek „szétkapcsolt”, (un-coupled) állapotot vesznek fel, így a redukált oxigén és az L-arginin reakció gátolt. Ekkor a NO helyett szuperoxid gyök keletkezik. A reduktáz domainben (FAD, FMN) az optimális elektron transzfert a Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin komplex biztosítja. Az endotél bazális NO szintéziséhez szükséges L-arginint képes maga előállítani, de megnövekedett igény esetén a sejt az L-arginint transzporterrel keresztül kívülről veszi fel. A ROS gátolja a NO szintézist: (1) A BH<sub>4</sub> gátlása révén fokozza az eNOS „un-coupled” állapotát, így a NO helyett szuperoxid gyök keletkezik, amely NO-dal további reaktív gyököket (pl. peroxinitrit gyök) képez tovább csökkentve a [NO]. (2) Az L-arginin transzporter gátlása valamint (3) az argináz enzim expresszió fokozása révén csökkenti a NO szintéziséhez a szubsztát mennyiségét. (4) Növeli az eNOS endogén inhibitorának (ADMA) szintjét, mely egyben az arginin transzporter kompetitív inhibitora. **NADPH**: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidált formája, **FAD**: flavin-adenin-dinukleotid, **FMN**: flavin-adenin-mononukleotid, **BH<sub>4</sub>**: tetrahidrobiopterin, **eNOS**: endoteliális nitrogén oxid szintáz, **O<sub>2</sub><sup>•</sup>**: szuperoxid gyök, **ONOO<sup>•</sup>**: peroxinitrit gyök, **Arg transzporter**: arginin transzporter, **L-arg**: L-arginin, **ADMA**: aszimmetrikus-dimetil-L-arginin, **EArg-áz**: argináz enzim, **ROS**: reaktív oxigén gyökök

#### 4.2.3 Gyulladásos folyamatok a vazospazmusban

A diszruptor ágensek kiváltotta érfal gyulladásnak szerepe van a vazospazmus kialakulásában. Számos tanulmány igazolja a gyulladás ateroszklerózist és endotél diszfunkciót provokáló szerepét [158,159]. Bizonyított, hogy a magas szenzitivitású C-reaktív protein (hsCRP) szérumszintje még egészséges egyénben is jó korrelációt mutat kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával [160]. Ismert, hogy a C-reaktív protein (CRP) az endotél sejtekben alulszabályozza az eNOS transzkripcióját, valamint destabilizálja az eNOS mRNS-t, mely a NO felszabadulásának csökkenéséhez vezet [161]. *In vivo* és *in vitro* tanulmányok bizonyították a tumornekrózis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pro-inflammatorikus citokin endotél diszfunkciót erősítő hatását [162]. A szakirodalom felveti az érfal enyhe krónikus gyulladásának koronária spazmusban betöltött szerepét [163]. Vazospasztikus anginában szenvedő betegek koszorúereinek falában gyulladásos sejtek megjelenését [164] valamint gyulladásos markerek (CRP, ICAM1, foszfolipáz A2, szolubilis P-szelektin) emelkedett plazmaszintjét igazolták [165,166]. Bizonyított, hogy a koszorúér spazmus patogenezisében szerepet játszik az endotél diszfunkció és az endotél csökkent NO generáló aktivitása [167]. Humán patológiai vizsgálatok a spasztikus koronáriák adventiciális gyulladásáról, valamint perivaszkuláris ideg-léziójáról számolnak be [168]. Az adeventícia gyulladásának koszorúerspazmusban betöltött szerepét ép endotél mellett *in vivo* sertés modellen végzett experimentális vizsgálatok is bizonyítják. Tanulmányok felvetik a gyulladás okozta vaszkuláris simaizomsejtek hiperreaktivitásának szerepét a vazospazmus kialakulásában [163,169]. Igazolt, hogy az interleukinok (IL) közül az IL- $\beta$  és TNF- $\alpha$  pro-inflammatorikus citokinek



a RhoA/Rho-kináz útvonal aktiválásával fokozzák a miozin filamentumok  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységét, mely a vaszkuláris simaizomsejt hiperkontrakciójához vezet [170,171].

#### 4.3 Endokrin Diszruptorok hatása az érfal kóros strukturális elváltozásaira

Az érfal szövettani rétegei: intima, media és adventícia. Az érfal mechanikai stabilitásában a mediát és az adventíciát alkotó simaizomsejteknek továbbá az extracelluláris mátrixnak jelentős szerepe van. A mediát és adventíciát alkotó sejtes és kötőszövetes elemek degenerálódása érfalgyengeséghez vezet. A strukturálisan meggyengült és funkciójában károsodott érfal a megnövekedett áramlási viszonyokra, nyíró erőkre adott maladaptív mechanizmus révén kitágul [172], mely kompressziós tünetekhez, súlyos esetben életet veszélyeztető vérzéssel járó ruptúrához vezethet.

##### 4.3.1 Reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepe az érfal strukturális zavarában

A diszruptor ágensek kiváltotta ROS-nak központi szerepe lehet az aneurizmák patomechanizmusában. Humán- és állatkísérletes vizsgálatok bizonyították a NADPH oxidázok, „uncoupled” (nem konjugált) eNOS, a mieloperoxidázok és xantin-oxidázok aorta aneurizmák keletkezésében betöltött szerepét [173,174].

Humán környezettoxikológiai vonatkozásokat csak a dohányzás kapcsán tárgyalja a szakirodalom ebben a témakörben. Kutatási eredmények igazolják, hogy a dohányfüst gáz- és korpuszkuláris komponenseinek szabadgyök tartalma a szervezetben további ROS generálásával hozzájárul az oxidatív stressz kialakulásához. Ez a hatás gyulladásos folyamatok beindítása révén aterotrombotikus betegségek manifesztációjához vezet [175]. Ismereteink szerint a dohányzás nemcsak az aterogenikus, hanem direkt érfal gyengítő mechanizmusok révén is kiváltja aneurizmák megjelenését. Ismert tény, hogy aktív dohányosokban szignifikánsan csökkent az artériák falában az I-es típusú kollagének valamint a kollagén fibrillum képződéséhez szükséges proteoglikán, a decorin mennyisége [176], továbbá, hogy a dohányfüst nikotin tartalma a ROS aktivációján keresztül fokozza az érfalak extracelluláris mátrixának elbontásáért felelős mátrix-metalloproteázok (MMP) közül a MMP-2 enzim expresszióját [177]. A dohányzás az extracelluláris mátrix degradációjával, valamint a *tunica media* simaizomsejteinek ferroptoziséval is hozzájárul az érfalak gyengítéséhez [178]. Ismert, hogy a ferroptozis a programozott sejthalál egy non-apoptotikus formája, amelynek mechanizmusában a vas és a ROS központi szerepével bír [179].

#### 4.3.2 Gyulladásos folyamatok szerepe az aneurizmák kialakulásában

Az aneurizmák kialakulásában az inflammatorikus mechanizmusoknak vitathatatlan szerepe van [180]. Számos szövettani vizsgálat talált gyulladásos eredetű sejteket, makrofágokat és leukocitákat az aneurizmák falában, melyek MMP és citokin termelésük révén elősegítik azok kialakulását [173]. Állatkísérletes modelleken végzett tanulmány alapján az érfalat infiltráló gyulladásos sejtek által termelt MMP-1, MMP-2, MMP-3, és MMP-9 [181,182], valamint a citokinek közül a TNF- $\alpha$ , interleukinok: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-23 és interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) direkt összefüggésbe hozható egyes aneurizmák kialakulásával, míg az IL-10 és transzformáló növekedési faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) protektív szerepűnek bizonyultak [183].

Környezeti expozítoroként a dohányzás érfal gyulladást kiváltó szerepe bizonyított humán vonatkozásban. Kísérletes tanulmányok igazolják, hogy a dohányzás (nikotin és további komponensei) hatására aktivált endotél sejtek fokozzák a leukociták érfelszíni kitapadását előidéző proteinek pl. intercelluláris adhézión molekula-1 (ICAM-1) és vaszkuláris adhézión molekula-1 (VCAM-1) kiválasztását, ezzel elősegítve a keringő leukociták megtapadását, majd érfali infiltrációját [184], továbbá fokozzák az érfalat infiltráló makrofágok IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  produkcióját [185].

## 5 Környezeti expozítorok diszrupciós és kardiovaszkuláris hatásai

### 5.1 Klórbenzol expozíciók

Ismert, hogy a humán populáció klórbenzol expozíciója elsősorban a gastrointesztinális rendszeren keresztül (szennyezett élelmiszer /pl. halak, vadhús/ illetve víz fogyasztása), a tüdőn (inhalációval) és a bőrön át (transzporttal) valósul meg a leggyakrabban [24,25,26], melyek közül a legjelentősebb expozíciós útvonalat a tápláléklánc jelenti. Noha a HCIB vízzoldékonysága rendkívül alacsony, előfordulása a felszíni vizekben Kanadában 0,018-2,2 ng/dm<sup>3</sup>, Németországban 3-62 ng/dm<sup>3</sup>, USA Texas államában 0,01- 0,61 ng/dm<sup>3</sup>, Hollandiában 0,1-100 ng/dm<sup>3</sup> koncentrációban igazolt. Ezáltal a vízi életközösségek folyamatos expozíciónak vannak kitéve és rajtuk keresztül a tápláléklánc is. A tápláléklánc résztvevőiben deponálódó, illetve feldúsuló HCIB végül jelentős humán expozícióhoz vezethet. A CIB vegyületek az International Programme on Chemical Safety (IPCS) (186) adatközlései szerint igen gyakori előfordulásúak a táplálékaink zsíros fázisaiban pl. az USA kereskedelmi forgalmában

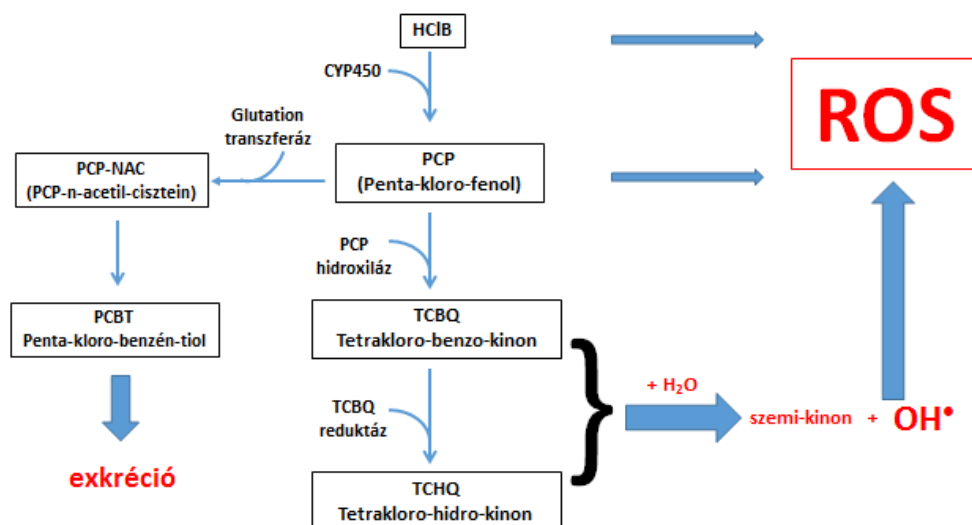


átlagosan következő dózisokban van jelen, a tojásban: 0,2 µg/kg nedves tömeg; a marhahúsban: 0,3 µg/kg nedves tömeg; a vajban: 0,6 µg/kg nedves tömeg. A lengyel lakosok 1996-ban becsült fejenkénti éves átlagos HCIB expozíciója 518 µg (1,4 µg/fő/nap) volt [187]. A kiragadott adatok jól prezentálják, hogy a humán populációt folyamatosan éri CIB expozíció a táplálkozási útvonalon át [188].

Mivel a CIB-ok lipofilitásuk révén átjutnak a placentán és koncentrálnak az anyatejben is, amelynek CIB koncentrációja korrelál az anyai szérum CIB tartalmával [189]. A HCIB-t az International Agency for Research on Cancer (IARC) 2B (humán karcinogenitása lehetséges) és 3A (bizonyítottan állati karcinogén) csoportba tartozó karcinogénként sorolta be. De ismert pajzsmirigy-, máj-, vese-, csont-, bőrfunkciók dózistól függő zavaró hatása is [190]. Állatkísérletek igazolták a HCIB tremort, hiperaktivitást, hiperexcitabilitást kiváltó, tanulást és memóriát zavaró hatásait is [191]. Humán esetben a prenatális, placentális HCIB expozíciók a spanyolországi Menorca-ban és Flix területén szignifikáns összefüggést mutattak a köldökzsinór vér magasabb HCIB tartalma és a társas kapcsolatok csökkenése, továbbá a figyelemhiányos hiperaktív viselkedészavar kialakulása között [192].

A CIB-ok ösztrogénszerű hatásai is igazoltak [193,194], amelyen keresztül feltételezhetően az adenohipofízisben prolaktinomák kialakulásához [195], de a periférián vazokonstrikcióhoz is [196] vezethetnek. A CIB-ok jelentős ROS képzők [197].

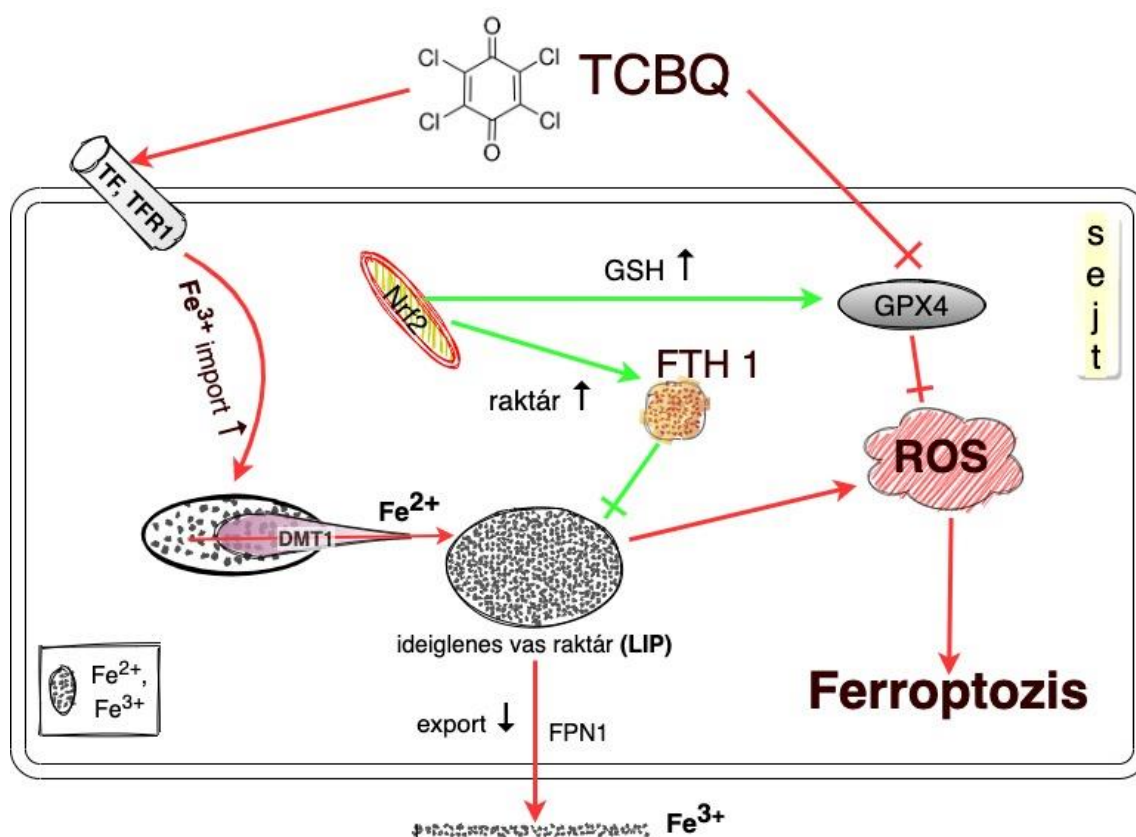
A HCIB metabolizmusa során igen reaktív intermedierek - pl. tetrakloro-benzo-kinon (TCBQ) és tetrakloro-hidro-kinon (TCHQ) keletkezhetnek, amelyek vizes közegben nagy mennyiségű OH-szabad gyököt generálnak [198] (6. ábra).



6. ábra HCIB intraorganikus metabolizmusa, valamint ROS képző potenciálja

A HCIB primer metabolitja a PCP, amely transzformációs folyamatot a CYP450 mono-oxigenáz enzimszrendszer katalizálja. A metabolizmus második, konjugációs fázisában a PCP glutation transzferáz enzim hatására glutationnal konjugálódik, ennek eredménye vízoldékony PCP-NAC és PCBT. A keletkezett metabolitok a vizelettel kiválasztásra kerülnek. A biotranszformáció első lépésében PCP-ből erősen reaktív TCBQ és TCHQ metabolitok keletkeznek a PCP hidroxiláz és TCBQ reduktáz enzimek révén, a keletkezett metabolitok a vizes közegben jelentős mennyiségű hidroxil- és szemi-kinon gyököket képeznek. A HCIB és metabolitjai közül a kinonok rendelkeznek a legjelentősebb ROS képző tulajdonsággal. **HCIB**: hexaklórbenzol, **PCP**: penta-kloro-fenol, **TCBQ**: tetra-kloro-benzo-kinon, **TCHQ**: tetra-kloro-hidro-kinon, **PCP-NAC**: penta-kloro-n-acetil-cisztein, **PCBT**: penta-kloro-benzén-tiol, **CYP450**: citokróm P450 mono-oxigenáz, **PCP hidroxiláz**: penta-kloro-fenol hidroxiláz, **TCBQ reduktáz**: tetra-kloro-benzo-kinon reduktáz, **OH<sup>•</sup>**: hidroxil gyök, **ROS**: reaktív oxigén gyök

A ClB-ok a keletkezett ROS-on keresztül gyulladásos, apoptotikus és ferroptotikus folyamatokat is generálhatnak, amely szervi diszfunkciókhoz vezet (7. ábra).



7. ábra Klórbenzol metabolitok ferroptozist indukáló intracelluláris mechanizmusai [199]

A ferroptosis megjelenése vas ionok intracelluláris akkumulációját és ROS képződést igényel. A ClB-ok metabolitjaikon (pl: TCBQ) keresztül mindkét feltételhez hozzájárulnak. A TCBQ egyrészt a TF és TRF1 génexpressziójának fokozásával elősegíti a  $\text{Fe}^{3+}$  felvételét a sejtbe, amely az endocitotikus vakuólumból a DMT1 segítségével a citoplazmába kerül és  $\text{Fe}^{2+}$  formában ideiglenesen raktározódik, másrészt csökkenti a felhalmozódott  $\text{Fe}^{2+}$  exportját a FPN1 expressziójának gátlásával. A TCBQ továbbá gátolja az antioxidáns GPX4 enzim expresszióját, hozzájárulva a ROS intracelluláris képződéséhez. A sejtek ferroptozisra adott védőmechanizmusának központi regulátora az Nrf2, amely a GSH biológiai aktivitásának fokozásával javítja a GPX4 funkciót. Ez csökkent ROS képződéshez vezet, valamint a FTH1 expressziójának fokozásához, amellyel hozzájárul az ideiglenes vas raktárak csökkentéséhez. **TCBQ**: tetra-kloro-benzo-kinon, **TF**: transferrin, **TFR1**: transferrin 1 receptor, **DMT1**: divalens metál transzporter 1, **LIP**:

ideiglenes vas raktár, **FPN1**: ferroportin 1, **Nrf2**: eritroid 2 eredetű nukleáris faktor, **GSH**: glutation, **GPX4**: glutation peroxidáz, **FTH1**: ferritin nehéz lánc 1, **ROS**: reaktív oxigén gyök

## 5.2 Fenilkarbamid expozíciók

Toxicitásuk elsősorban a methemoglobinémia kialakulásával hozható összefüggésbe, ami gyengeséget, szinkopét, tachikardiát, kardiorespiratórikus zavarokat generál [200]. A DU egyik metabolitja a 3,4-diklóranilin (3,4-DCA), amely toxikusabb a kiindulási anyagnál. Humán- és ökotoxikológiai hatásai között ismert a karcinogenitása [201]. A peszticidek erős expozíciói acetilkolin észteráz enzim (AChE) gátlást eredményeznek, amelynek következménye az agy, valamint az érintett idegrendszeri elemek idegvégződéseiben, továbbá a vérben az acetilkolin (ACh) koncentráció fokozódás [202]. A fenilurea vegyületek és diuron toxikológiai szerepét az aril-szénhidrogén receptor (AhR) ligandfüggő transzkripció faktor közvetíti. A DU CYP1A1 mRNS-szintet indukált egér hepatoma (Hepa1c1c7) sejtekben és AhR-függő luciferáz riportergén expressziót stabilan transzfektálta egér, patkány, tengerimalac és humán sejtvonalakban [203]. Longitudinális vizsgálattal igazolták, hogy a vegyszermentes gazdálkodók és a herbicideket alkalmazók (pl. DU) pajzsmirigyhormon szintje között szignifikáns eltérés mutatkozik (DU /TSH emelő/), ami az anyagcsere paraméterek (triglicerid, a koleszterin: a HDL/LDL, stb.) zavarával is társul [204]. Tanulmányok igazolták a diuron ROS generáló potenciálját zöld algákban [205], osztrigafélékben [206], halakban [207] és humán tumoros sejtekben [208] is. Valamint ismert, hogy a sorafenib, mely egy tumorellenes szerként törzskönyvezett vaszkuláris endoteliális növekedési hormon (VEGF) inhibitor tulajdonságú fenilurea származék, az eNOS gátlásán keresztül endotél diszfunkciót okozhat [209,210] valamint RhoA/Rho kináz útvonal aktiválásán keresztül simaizomsejtek hiperkontrakciójához és életet veszélyeztető koszorúérgörcshöz vezethet [211,212]. A fenilureák közvetett toxikológiai mechanizmus (hasmenés, hányás) kapcsán jelentős hipokalémiát okozhatnak.

## 6 Célkitűzés

Jelen munkában a környezeti expozíciók vizsgálatát céloztam *in vivo* és *in vitro* biológiai rendszermodellekben azzal a céllal, hogy a vizsgálatokban alkalmazott halogénezett és/vagy aromás szénhidrogén hatótényezőkről megállapíthassam esetleges ED hatásait, valamint az így triggerelt háttérmechanizmusokat. További, stratégiai célom volt, hogy experimentálisan az alkalmazott hatótényezők ED hatásait kutatva találjak kapcsolatot a humán vonatkozásokkal és következményesen egyes, a periférián kialakuló patológiás eseményekkel. A környezettoxikológiai kísérletes vizsgálatok eredményeinek és ezek lehetséges biológiai háttérmechanizmusainak ismeretében, a feltárt információkat az orvosi diagnosztikában, a preventív medicinában és az esetleges terápia tervezések során kívántam hasznosítani az érszűkület, vagy aneurizma képződéssel járó kardiovaszkuláris megbetegedéseknél.

Vázolt céljaimat megalapozta az a tény is, hogy a kardiovaszkuláris megbetegedések nemzetközi szakmai ajánlásai nem foglalmazzák meg karakterisztikus kockázati tényezőkként a környezeti expozíciók szerepét a nevezett érszűkület, vagy aneurizma betegcsoportok kialakulásában. Noha a kardiovaszkuláris betegségek gyakorisága világszerte igen magas és a vezető halálokok közé sorolható hazánkban is. Nagy jelentőségű lehet ebben a kontextusban a napi életvitel során jelentkező expozíciós útvonalak azonosítása és a hatások tematikus vizsgálata, ami csak experimentális modellek alkalmazásával lehetséges. A humán vonatkozásokat viszont a hatótényezők kísérletes hatásvizsgálataival feltárt biológiai mechanizmusokkal, mint csomópontokkal kapcsolatba hozhatjuk, támogatva ezzel a klinikai gyakorlatot.

Dolgozatomban az állatkísérletes kutatási munkák a homeosztatikus szabályozási elemek tanulmányozására és azok háttérmechanizmusainak feltárására irányulnak, így ezek vizsgálatához először a kísérletek, mint modellvizsgálatok tervezése, kidolgozása és standardizálása volt a cél. Így feladatnak tekintettem a kísérleti modell olyan hatótényező és hatás rendszerének kialakítását, amely valóban biztosítja a lehetőséget az experimentális munka eredményeinek az orvosi gyakorlatba történő extrapolálásához.

Ph.D. disszertációmban először a homeosztatikus diszrupciós eseményeket meghatározó kémiai expozíciós vizsgálatok elvégzését céloztam, majd a detektált hatások érszűkület és aneurizma rendszereket érintő, az orvosi gyakorlat számára kapcsolt jelentőségét kívántam vizsgálni.

A fent vázoltak kutatásához a következő problémakörök megoldására kerestem a választ, illetve próbáltam ezekkel a vizsgálatokkal a további kutatásaimhoz feltárandó tématerületeket meghatározni.

**1.** A munka során első igénypont a standardizált *in vivo* és *in vitro* állatkísérletes (Wistar patkány) vizsgálati modellek kialakítása, amelyekben a(z)

**a,** táplálkozási expozíciós útvonal beállítása volt az elsődleges cél.

**b,** adenohipofízis általunk indukált prolaktinomás transzformációja igazoltan megvalósul, ezáltal olyan kutatási modell kialakítása, amellyel patológias állapotokban is tanulmányozhatók az expozíciós események.

**c,** kémiai terhelést jelentő hatótényezők (mCIB: TCIB+HCIB) *in vivo* expozícióinak szubtoxikus dózisa és a kezelési időtartamok meghatározásra kerülnek.

**2.** A neuroendokrin reguláció környezeti hatótényezőkre bekövetkező esetleges változásainak a tanulmányozása azt a célt is szolgálta, hogy az endokrin hatások mellett feltárásra kerüljenek azok a kapcsolt *celluláris* mechanizmusok is, amelyek a vazospasztikus angina vagy az aneurizmák kialakulásában szerepet játszhatnak. Továbbá vizsgálandó volt, hogy az *organizmus* szinten detektálhatók-e az *in vivo* mCIB kezelések hatásai (szérum hormonszintekben és viselkedési elemek módosulásaiban). Valamint a kapott eredmények összefüggésbe hozhatók-e a vazospasztikus angina vagy az aneurizmák kialakulásával?

**a,** A 2. célkitűzési pont tanulmányozásához először az adenohipofízis esszenciális ACTH hormonelválasztásának vizsgálata; majd a regulációs mechanizmusok követéséhez a *hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely* működésének *in vitro* adenohipofízis sejt kultúra (AdH) és prolaktinomás adenohipofízis primer sejt kultúra (PRLOMA) szabályozási ciklusmodell kialakítása volt a cél.

**2aa,** A beállított, standardizált kísérleti rendszerben tanulmányozni kívántam továbbá, hogy a CIB-ok és fenilurea kezelések mennyire érintik az ACTH és a PRL release-t?

**2ab,** Az *in vivo* CIB kezelés megváltoztatta-e a vérplazma ACTH tartalmát?

**2ac,** Továbbá vizsgáltam, hogy a CIB expozíciók a  $Mg^{2+}$ -ATPáz aktivitására milyen hatással vannak?

**b,** A *celluláris* és *organizmus* szintű kutatási protokollok összekapcsolásával kívántam tanulmányozni a neurohipofízis monoamin (NA /noradrenalin/, 5-HT /szerotonin/) aktivált *in vitro* (neurohipofízis sejt kultúra: NH) ciklusmodelljében

az *in vivo* CIB (mCIB: TCIB+HCIB) kezelések hatásait az AVP és OT elválasztására.

**2ba,** Továbbá, vizsgálni kívántam még, hogy az *in vivo* mCIB kezelések miként hatnak a plazma AVP és OT tartalmára? Fontos volt a stratégiai céloom (az extrapolálás) szempontjából, hogy az esetlegesen detektálható változás összefüggésbe hozható-e az *in vitro* CIB hatáseredményekkel?

**c,** Jelentős kérdéskört képviselt az organizmus szinten zajló kutatások során, hogy az AVP és/vagy OT által is mediált viselkedésmintázatok a CIB-ok jelenlétében mutatnak-e értékelhető változásokat? Továbbá, milyen általános celluláris mechanizmusokkal hozhatók kapcsolatba az észlelt hatások?

**3.** A gyakran bekövetkező közvetett ED hatás vizsgálatához a lokális, extracelluláris ionmilieu (pl.  $[K^+]$ ) változások modell vizsgálataival az is céloom volt, hogy tanulmányozásra kerüljön, miként valósul meg az egészséges és transzformált sejtek relációjában a környezeti hatótényezőkre kialakított válaszmechanizmus? Továbbá a kialakult hatótényező/hatáseredmények milyen alapmechanizmussal zajlanak? Ezen kérdéskör megválaszolásához az alábbi részcélokat kívántam tanulmányozni:

**a,** Első lépésben a kutatási követelményeket kielégítő *in vitro* vizsgálati protokoll kialakítása volt a cél.

**b,** Majd a kitűzött cél szerinti kérdés megválaszolásához vizsgáltuk, hogy az *in vitro* AdH és PRLOMA sejtek lokális hipokalémiában miként változtatják meg az esszenciális (ACTH) és nem esszenciális (PRL) hormon release funkciókat és ezek a két modellben mennyire eltérőek?

**3ba,** Továbbá, milyen mechanizmussal hozhatók összefüggésbe a hipokalémiában észlelt hormonelválasztási kinetikák?

**4.** Az experimentális tapasztalatok alapján merült fel a kérdés, miszerint az ED vegyületek kiválthatnak-e olyan kardiovaszkuláris hatásokat, amelyek funkcionálisan a vazospazmushoz, vagy strukturálisan aneurizma megjelenéséhez vezetnek?

**a,** Jelen kérdéskör tanulmányozásához először a nevezett betegségek invazív diagnosztikus és terápiás megoldásait kell vizsgálni:

**1.** vazospasztikus angina esetén

**2.** aneurizma esetén.

**b,** Ezután vizsgálandó, hogy a tanulmányozni kívánt betegségek kialakulásában milyen lehetséges szereppel bírhatnak a környezettoxikológiai szempontból jelentős ED vegyületek?

## 7 Módszerek, anyagok

### 7.1 *In vivo* kutatási protokollok

#### 7.1.1 Alkalmazott expozíciók és kísérleti csoportok

A kísérletek során a hím Wistar törzsű patkányokat (Charles River, Isaszeg, Magyarország, a kísérletek kezdetén 120-150 g tömegű, 4-6 hetes) HCIB és TCIB 1:1 arányú keverékével (mCIB) kezeltük, megelőző expozíciós dózisbeállítások után. A vizsgálatainkban táplálkozási útvonalon keresztüli expozíciós útvonalat alkalmaztuk. A kísérleti állatokba gyomorszondával (csecsemő gasztrikus szonda) a mCIB bejuttatás: napi 10,0 µg/testtömeg kg (ttg kg) / vagy 1,0 (D2) µg/ttg kg, vagy 0,1 (D1) µg/ttg kg dózisban; 1 ml végtérfogatban; 0, 30, 60 és 90 napon keresztül történt.

A kezelési protokoll standardizálásakor vizsgálatainkhoz a következő csoportokat képeztük:

*Kontroll csoportok:*

- Abszolút kontroll csoportok: (kontroll) kezeletlen/nem stresszelt állatok (n=10).

- Stressz kontroll csoportok: (SC) 0, 30 (n=10, SC-30 csoport), 60 (n=10, SC-60 csoport) és 90 (n=10, SC-90 csoport) napon át üres gyomorszonda kezelésben részesültek.

- Pozitív kontroll csoport: (+C) az állatok a kezelési protokoll során, a gyomorszondán 0, 30, 60 és 90 napon át a CIB szolvensét (0,001 ezrelékes etanol oldat) kaptak 1 ml-es végtérfogatban (n=10).

- Negatív kontroll csoport: (-C) a kísérleti állatok a kezelési sémában gyomorszondán át, ismert anyagtartalmú ivóvizet kaptak 1 ml végtérfogatban; 0, 30, 60, és 90 napig (n=10).

*CIB kezelési csoportok:*

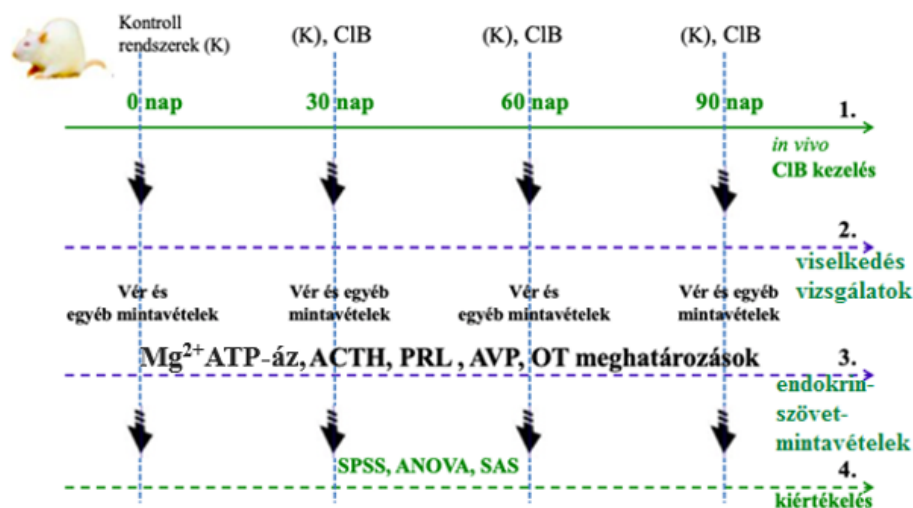
- CIB kezelt csoportok: 30, 60 és 90 napos kombinált klórbenzol expozíciós csoport (10 állat/csoport/kísérletsorozat, 5 kísérletsorozatban), melyeket gasztrikus szondán keresztüli táplálkozási séma szerinti expozíciós úton kezeltük.

##### 7.1.1.1 *Kísérleti protokoll*

A már bemutatott kísérleti csoportokban 0, 30, 60 és 90 napon át történtek a modellállatok kezelései. A CIB kezelések megfelelő időpontjaiban végeztünk viselkedésvizsgálatokat (a hímek közötti agresszivitást módosított resident-intruder (RI)

[213]; a szorongást open field (OF) [214] és elevated plus maze (EPM) [215] tesztekkel mértük) (8. ábra).

#### *In vivo* mCIB kezelt Wistar patkányok ED hatásvizsgálatai



Fehérjemérés: Pierce BCA Protein Assay Kit-tel; Hormonmeghatározás: RIA, LIA módszerrel;  $Mg^{2+}$ -áz aktivitás: módosított Martin-Doty módszerrel; Statisztika: kétutas ANOVA módszer és SAS program;

#### **8. ábra** *In vivo* kísérleti protokoll a mix-klórbenzol (mCIB) kezelések hatásának vizsgálatában

(1. Kezelési időtartam és az expozíciós módok megjelenítése. 2. A viselkedés vizsgálatok (open-field teszt (OF), az elevated plus maze teszt (EMP), resident-intruder (RI) teszt). 3. Kezelések szerinti mintavételek (vér: májenzimek; vérplazma hormon meghatározások; szövetminták: toxikológiai vizsgálatok; *in vitro* modellekhez szövetminták). 4. Statisztikai analízis, kiértékelés.)

A viselkedés-vizsgálatok után a kísérleti állatokból alvadásgátolt és natív vérmintákat nyertünk, melyek plazmájából az OT, AVP és PRL hormonokat radioimmunoassay (RIA), az ACTH hormont immunokemilumineszcencia (LIA) módszerrel detektáltuk. A szérumból a májfunkciókat jelző májtranszferáz enzim volumeneket (szérum glutamát-oxálacetát-transzamináz (SGOT) [216], szérum glutamát-piruvát-transzamináz (SGPT) [217] és gamma-glutamil-transzpeptidáz (GGT) [218]) mértük, melyekkel a CIB expozíciók toxicitási értékeit követtük (8. ábra).

A kezelések során és/vagy a kezeléseket követően az adott kezelési sémához tartozó állatok testtömegét mértük, valamint a kezelési időszám lejártaival a fontosabb szervek tömegét (máj, lép, vese, mellékvese, stb.) is detektáltuk. A testtömegváltozásokból és a májenzimek szérum szintjeiből származó adatokkal igazoltuk a kísérleteinkben alkalmazott klórbenzol ágensek szubtoxikusságát.



A kezelt patkányok hipofíziséből primer, monolayer neurohipofízis (NH) és adenohipofízis (AdH) sejt kultúrákat készítettünk. A megfelelő korú *in vitro* monolayer kultúrák ACTH, AVP, OT elválasztásának időkinetikáját követtük, így határoztuk meg az *in vitro* kísérletekben alkalmazandó kezelési időszávokat. A hormon release szabályozásában jelentős monoaminok közül a NH kultúrák 5-HT és NA receptorainak jelenlétét igazoltuk a kísérleti protokoll standardizálásához, valamint meghatároztuk a NH kultúrák 5-HT és/vagy NA mediált AVP és OT elválasztását RIA módszerrel [37,38].

#### 7.1.1.2 Viselkedés vizsgálatok

A viselkedés-teszteknél a vizsgálatainkhoz minden állatot egyszer használtunk. A teszteket azonos körülmények mellett (stressz szegény: pl. gyengén megvilágított helyiségben) végeztük. A teszteket 1 órás, habituálódási időt követően indítottuk. A kísérleti protokoll szerinti csoportbeosztású állatokat (véletlenszerű sorrendben) vontuk be a vizsgálatokba. A kísérleti apparátust minden próba előtt 70%-os (v/v %) etanollal megtisztítottuk, hogy elimináljuk a keletkezett szagok állatra/viselkedésére gyakorolt esetleges hatásait. A vizsgálatokat az arénák teljes exszikálódása után végeztük. A mutatott viselkedési elemeket a tesztapparátus felett, a mennyezetre erősített kamerával, illetve egy hozzá kapcsolt viselkedési szoftver: az *Ethovision* (v2.3, *Noldus Information Technology, Wageningen, Hollandia*) [219] segítségével rögzítettük, majd elemeztük.

##### 7.1.1.2.1 Open field (OF) teszt

Az OF teszt standardizált metodika, a rágsálókra jellemző lokomotoros aktivitás, felfedező viselkedés, kíváncsiság, szorongás és habituálódás tanulmányozására [214]. A kísérleti állatot egy felülről nyitott, szabványos méretű (45 cm magas, 80 cm átmérőjű, kör alakú) szürke, csúszásmentes padlójú üres aréna közepére kell helyezni. A vizsgálat során a következő paraméterek kerültek megfigyelésre és rögzítésre komputerizáltan és a vizsgálatok utólagos ellenőrzését végző személyek által: az állat által a centrumban és perifériás zónában eltöltött idő; az állat mozgásának átlagsebessége; az állat által a mozgással eltöltött idő és a megtett út; az állat ágaskodásainak (rearing) frekvenciája és időtartama; a tisztálkodások száma; a vakarózások száma; a freezing-ek száma, a székletek (faeces) száma. Az állatok viselkedése 5 perces időszávban került rögzítésre.

##### 7.1.1.2.2 Elevated plus maze (EPM) teszt

A rágsálók szorongásának vizsgálatára alkalmas standard eljárás az EPM teszt [215]. A tesztapparátus szabványos és standardizált rendszerű (közös, centrális területből kiinduló

4 db, egymásra merőleges, perifériás, egyenként 50 cm hosszú – két nyitott, oldalfal nélküli és két zárt, 8 cm szélességű karból felépülő) aréna. A tesztmodszertan és az adatkiértékelés is standardizált. Az apparátus alatti terület fekete anyaggal lefedett, csökkentve a magasság észleléséből származó (félelemkeltő) tényezőket. A vizsgálat kezdetén az állatot a centrumba helyezzük, egy adott nyitott karral szemben. A vizsgálat során, a következő paraméterek kerültek megfigyelésre (komputerizált és utólagos ellenőrző emberi kiértékeléshez): a nyitott és a zárt karokban töltött idő teljes tartama; az előnyben részesített (preferált) terület (a nyitott területen töltött idő és az apparátusban töltött idő aránya százalékban megadva); a zónákba történő belépések száma; az ágaskodás, tisztálkodás, szimatolás, freezing frekvenciája és időtartama. Az állatok viselkedése ebben a tesztben 3 percen át volt detektálva.

#### 7.1.1.2.3 Hímek közötti agresszivitás vizsgálata (RI teszt)

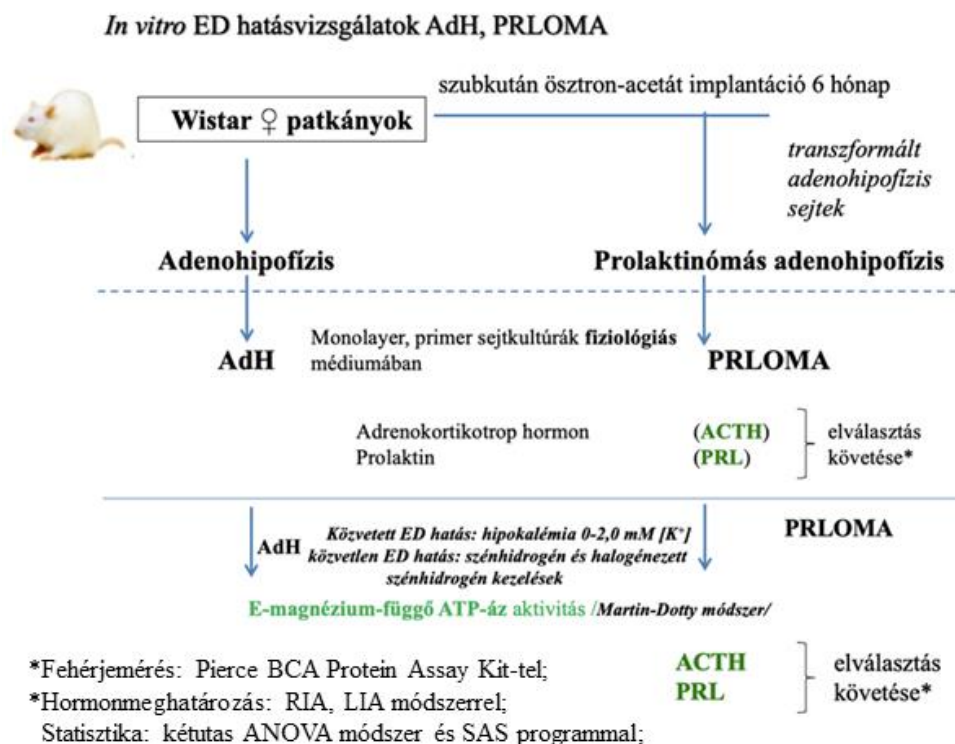
Kísérleteink során az agresszió vizsgálatára módosított RI tesztek [213] használtunk. A bentlakó (resident) állat egy forgáccsal borított területen 5 percen át habituálódott. A tesztben rögzítésre kerültek a resident („bent lakó, habituált”) állatra jellemző lokomotoros/exploratív és a szorongásos viselkedéselemek. A habituációt követően, a kísérlet 6. percében a betolakodó (intruder) állat a resident mellé kerül. Az állatok között megfigyelhető interakciók és azok időtartama és/vagy frekvenciája és/vagy latenciája került rögzítésre (komputerizáltan), majd kiértékelésre digitalizáltan és kontroll személy által: *A*, a resident állatra jellemző lokomóció, felfedező magatartás, szaglászás, freezing, mosakodás mellső végtagokkal, vakarózás hátsó végtagokkal. *B*, szociális viselkedési formák: intruder állat mosdatása, nazo-nazális és nazo-genitális kapcsolatok. *C*, offenzív viselkedési formák: fenyegető testtartás (intruder állat fölé magasodás, rámászás, alacsonyabb pozitúrába való kényszerítés), támadás (elsősorban a hát és nyaktájékon a bunda és a bőr harapása a fej gyors mozgatásával, mellső végtagokkal való ütés, laterális irányú szurkálások, nyomások), a menekülő intruder állat gyors üldözése. *D*, defenzív viselkedési formák: védekező testtartás (intruder állat támadása ellen hátsó lábra állás vagy összekuporodás, távolságtartás lehetőségének keresése, megadási készség, menekülés). Ez a tesztvizsgálat 5 percen át zajlott.

#### 7.1.1.3 Prolaktinomás adenohipofízis *in vivo* indukciója ösztron-acetát implantációval

Az *in vivo*, 6 hónapon át, szubkután beültetett ösztron-acetáttal (150 µg/ttg kg/hét) Wistar törzsfű ♀ patkányoknál prolaktinomás adenohipofízis megjelenését váltottunk ki. A prolaktinomás adenohipofízis kialakulását a vérplazma PRL szintjének mérésével

(emelkedés) kontrolláltuk [220]. A steril körülmények között eltávolított prolaktinomás adenohipofízisből PRLOMA sejtenyészeteket készítettünk, a további *in vitro* vizsgálatokhoz (9. ábra).

## 7.2 *In vitro* vizsgálatok



**9. ábra** *In vitro* ED hatásvizsgálatok AdH és PLOMA modelleken

### 7.2.1 Adenohipofízis monolayer sejt kultúrák (AdH)

A Wistar patkányokból steril körülmények mellett eltávolított hipofízisből volt szeparálva az adenohipofízis. Ebből a sejtek enzimatis - (30 perc, trypsin [0,2 %] és 40 perc, kollagenáz [50 µg/ml] és 40 perc, diszpáz [50 µg/ml] és 20 perc, DN-áz [30 µg/ml]) -, és mechanikus (nejlon-blutex filter 43 µm Ø) disszociáltatással kerültek elválasztásra. Majd DMEM + 10% FCS + 10 U/ml Pen-Strep tápoldatban 2x10<sup>5</sup> sejt/ml-re beállított sejtszuszpenzió koncentrációnál meghatározásra került a sejtek viabilitása, Trypan-blue tesztel (≥ 95 %). A szuszpendált sejteket 5% kollagénnel felületkezelte műanyag tenyésztőedényekben, 3 naponként friss tápoldattal mostuk és széndioxid inkubátorban kontrollált körülmények között tartottuk. Az ACTH tartalom (immunoreaktív (IR) ACTH tartalmú sejtek relatív gyakoriság alapján) és elválasztás szerint: specifikus (AVP) és aspecifikus (30 mM kálium) stimuláció szerint történt a tenyészetek standardizálása. Az ACTH release vonatkozásában, 5–7 %-nál nem nagyobb eltérést mutató mintákból voltak képezve a kutatási csoportok. A konfluens, primer, monolayer adenohipofízis

tenyészetek (AdH)-et morfológiai, sejtttranszformációs tulajdonságok, energia transzfer, membránfunkciók tekintetében kontrolláltuk [39], így vált igazolttá a kísérleti protokoll citotoxicitási hatásokról való mentessége, pl. az alkalmazott ClB dózisoknál [216, 217, 218].

A PRLOMA sejtkultúra modellek kialakítása az AdH monolayer sejtkultúrák előállítási és standardizálási metodikájában leírtaknak megfelelően történt.

### 7.2.2 Neurohipofízis monolayer sejtkultúrák (NH)

Az adott állatból preparáló mikroszkóp segítségével, steril körülmények mellett a neurohipofízis szeparálása történt, melynek enzimátikus / (30 perc, tripszin [0,2%] és 60 perc, kollagenáz [50 µg/ml] és 60 perc, diszpáz [50 µg/ml] és 30 perc, DN-áz [30 µg/ml])/, majd mechanikus (nejlon-blutex filter 80 µm Ø) frakcionált disszociáltatása zajlott. A neurohipofízis sejtuszpenzió viabilitás kontrollja Trypan-blue tesztel ( $\geq 95\%$ ) DMEM + 20% FCS + 30U/ml Pen-Strep tápoldatban zajlott. A  $2 \times 10^5$  sejt/ml koncentrációjú sejtuszpenziót 5% kollagénnel felületkezelt műanyag tenyésztőedényekben, 3 naponként friss tápoldattal mosva, széndioxid termosztátban tartottuk, amíg konfluenssé váltak. A konfluens, primer, monolayer neurohipofízis sejtkultúrák (NH)-at standardizálást követően - IR OT és VP tartalmú sejtek relatív gyakoriságának meghatározása és specifikus és aspecifikus hormon elválasztások detektálás után -, kísérleti prorkollokba vontuk. A kapott eredmények 5-7%-nál nem nagyobb eltérést mutató mintáiból voltak képezve a vizsgálati protokoll csoportok. A NH tenyészetek morfológiai, sejtttranszformációs viselkedés, energiatranszfer, membránfunkciók tekintetében voltak kontrollálva [37, 38].

### 7.2.3 In vitro kísérletek

A monolayer AdH és NH sejtkultúrák felülúszó médiumait FCS mentes fiziológiás tápoldatra cseréltük (DMEM). Az *in vitro* kísérleti protokoll 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 perces időpontjaiban mintákat vettünk speciális műanyag-csövekbe, melyeket azonnal -70 °C-on tároltunk a mérésig. Az összegyűjtött mintákból RIA vagy LIA módszerekkel NH kultúrákból AVP és OT, AdH kultúrákból ACTH és PRL hormonokat mértünk. Az alap hormonfelszabadulás kinetika felvétele után, a tenyészeteket ismét mostuk, majd 12 órán át fiziológiás körülmények között tartottuk. Ezután 30 mM kálium indukcióval aspecifikus hormon felszabadulási kinetikát határoztunk meg [37,38,39], majd a mosást követő 12 órás nyugalmi fázis után az ACTH elválasztást AVP-nel, az NH hormonok (AVP, OT) elválasztását monoaminokkal (5-HT, NA) indukáltunk. A

hormonelvásztás idő- és dóziskinetikáit is detektáltuk a kísérleti protokollok beállításához.

#### *Diszruptor hatással kiváltható extracelluláris hipoónia modellezése*

A közvetett diszruptor hatások vizsgálatához hipokalémiás kísérleti protokoll került beállításra. *In vitro* modellként AdH és PRLOMA tenyészetek voltak alkalmazva. A kontroll csoportok ACTH és PRL elválasztását fizioológias Tyrode oldatban tanulmányoztuk. A kezelési mintáknál az extracelluláris izoállapotok megtartása mellett, a PRLOMA és AdH sejt kultúrákat izoniás Tyrode oldatban (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mM; n = 10 /csoport) vizsgáltuk és követtük a releaselt ACTH és PRL kinetikáikat t = 10, 20, 30, 60 and 90 percen át. A kísérleti protokoll adott időpontjaiban mintát vettünk speciális műanyag csövekbe és azokat mérésig -80 °C-on tartottuk. A mérések során ACTH és PRL került meghatározásra.

#### *Immunhisztokémiai vizsgálatok*

- A kutatási protokollokban alkalmazott sejt kultúrák standardizálása során sejtenyészet-minták fixálását paraformaldehiddel végeztük. A fixált NH kultúrák AVP és OT tartalmú sejtjeit, az AdH és PRLOMA kultúrák ACTH és PRL tartalmú sejtjeit specifikus anti-hormon antitesttel, PAP/DAB (3,3-diaminobenzidin tetra-hidroklorid alkalmazásával) módszerrel mutattuk ki.
- A hipokalémiás kísérleteknél szintén PAP/DAB módszerrel vizsgáltuk 0 mM [K<sup>+</sup>] jelenlétében az AdH és PRLOMA kultúrák apoptózist Bcl-2 specifikus immuncitokémiai festéssel. Az immuncitokémiai festések eredményeit Olympus kamerával (Olympus C-7070) ellátott fáziskontraszt invertoszkóppal (Zeiss) tanulmányoztuk.

#### *Mg<sup>2+</sup>-ATP-áz meghatározás*

A Mg<sup>2+</sup>-függő ATP-áz aktivitás meghatározása módosított Martin-Dotty (Martin, Dotty, 1949) módszerrel történt. Az ATP-áz aktivitás értékeit a kontroll %-ában fejeztük ki.

#### **7.2.4 NH monoamin indukált exocitózis vizsgálatok**

A kialakított és standardizált kísérleti körülmények mellett először a tenyészeteket mostuk, majd a kultúrákat 120 percig inkubáltuk. Az inkubációt követően a felülúszókból mintát vettünk az alap AVP/OT szintek meghatározására, melyeket RIA módszerrel való méréséig -70°C-on tároltuk. A kísérleti (kontrollok és halogénezett és/vagy aromás

szénhidrogén kezelt) állatokból nyert konfluens kultúrákat *in vitro* 60 percig inkubáltuk  $10^{-6}$  M koncentrációban 5-HT-nal vagy NA-nal. A kezelési időtartamok végén a sejt kultúrák kondicionált médiumait begyűjtöttük,  $-70^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottuk, majd a későbbiekben RIA módszerrel meghatároztuk a szekretált AVP és OT koncentrációkat [37, 38].

#### 7.2.5 NH ClB és Uron kezelése

A NH sejt kultúrák kezelésekor mClB (0,1 vagy 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) dózisban és uronok  $10^{-6}$  M (fenuron: /PU, CAS regisztrációs szám: 101-42-8/, diuron /DU, CAS regisztrációs szám: 330-54-1/ és monuron /MU, CAS regisztrációs szám: 150-68-5;/ Sigma, Germany) koncentrációban voltak expozitorként alkalmazva. A NH hormonregulációs folyamatokat NA és 5-HT jelenlétével modelleztük. Az alaprelease (bazális) hormonszintek és monoamin ( $10^{-6}$  M) aktivált hormonvolumenek detektálása után, az adott kísérleti protokoll szerint önállóan (mClB, PU, MU, DU) és monoamin kombinációban (NA+mClB; NA+PU; NA+MU, NA+DU; 5-HT+mClB, 5-HT+PU, 5-HT+MU, 5-HT+DU) történt a kezelés (n=10/csoport). A protokollok szerinti kísérleti időpontokban történt a felülúszó médiumokból a mintavétel (500  $\mu\text{l}$ ) speciális műanyag csövekbe és a mérésig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mintákat [195].

#### 7.2.6 Hormon mérések

##### 7.2.6.1 AVP, OT, ACTH és PRL meghatározás felülúszó médiumból

A NH sejt kultúrák felülúszó médiumaiból az AVP/OT szintek meghatározásához alkalmazott protokollokat az irodalom szerint használtuk [37,38]. A médiumok a mintavételt megelőzően, a sejt kultúrák kezelési sémái szerint voltak kondicionálva. A sejt kultúrákról a felülúszót eltávolítottuk, majd a mérés kezdetéig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintákból módosított RIA módszerrel történt az AVP vagy OT meghatározása [221,222,223]. Az alkalmazott assay mérési tartománya a standard görbék alapján 1-128 pg/cső AVP; OT esetén 5-121 pg/cső. A módszer AVP/OT érzékenysége 1 pg/assay cső volt. A minták fehérjetartalmát módosított Lowry módszer szerint [224] határoztuk meg. Eredményeinket mg fehérjetartalomra vonatkoztatva adtuk meg.

Az ACTH meghatározása LIA módszerrel zajlott, az SZTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Osztály mérőberendezésének alkalmazásával (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL, USA, és DPC kit (L2KAC-2; Euro/DPC Ltd, Glyn Rhonwy, UK) [39,195,225]). A PRL meghatározása RIA



módszerrel zajlott (PRL RIA KIT /Institute of Isotopes Ltd., Budapest, Hungary/) [226]. A minták fehérjetartalmát módosított Lowry módszer szerint [224] vagy Pierce BCA Protein Assay Kit-tel határoztuk meg. Eredményeinket mg fehérjetartalomra vonatkoztatva adtuk meg.

#### 7.2.6.2 AVP, OT, ACTH és PRL meghatározása plazmából

A kísérleti állatokból, a dekapitációt követően EDTA-t tartalmazó poliszitirén csövekbe gyűjtöttük a vérmintákat. A csöveket centrifugáltuk (4 °C, 8000 rpm, 10 perc), majd a plazmát leszívtuk és -70 °C-on tároltuk a mérésekig. A plazma AVP/OT/ACTH/PRL szintek RIA-al vagy LIA-val való meghatározása történt [221, 222, 223, 225, 226].

#### Anyagok

Kutatásainkhoz felhasznált anyagokat az Invitrogen Corporation-től (*Carlsbad, CA, USA*) és a Sigma-Aldrich Corporation-től (*St. Louis, MO, USA*) szereztük be. A sejtkultúra technikákhoz az egyszer használatos tenyésztő edényeket (Petri csésze, plate, stb.) és az automata pipettahegyeket a BD-Biosciences (*San Jose, CA, USA*) forgalmazta számunkra. A sejtek tenyésztéséhez Foetal Calf Serum (FCS) szupplementált Dulbecco's Modified Essential Medium-ot (DMEM) vagy Minimal Essential Medium-ot (MEM) alkalmaztunk, amelyek GIBCO termékek voltak. Az antibiotikumok (Penicillin, Streptomycin) és a kísérleti protokollokban alkalmazott kémiai expozitorok a Sigma-Aldrich termékei voltak.

### 7.3 Kísérleti állatok

Az expozíciós vizsgálatainkba hím (*a kísérletek kezdetén max. 120-150 g tömegű, 6-8 hetes*) Wistar (*Charles River, Isaszeg, Magyarország*) patkányokat vontunk be. A PRL-OMA indukciókhoz Wistar ♀ (120-150g a kezelések indításakor) egyedeket alkalmaztunk (melyeket fél éven át heti szubkután kezelésnek tettünk ki). Az állatokat kontrollált körülmények (hőmérséklet, relatív páratartalom, fény/sötét periódus) mellett, 32x40x18 cm méretű ketrecekben tartottuk (ketrecenként maximum 3 állat). Az expozíciós kísérleteknél az állatokból már bemutatott kezelési csoportokat alakítottuk ki.

A viselkedés-vizsgálatokba (agressziós tesztek során intruderként) bevonandó kisebb hím (*a kísérletek kezdetén 200-250 g, 4-6 hetes*) Wistar patkányok elkülönítetten, de azonos körülmények között voltak tartva.

Az állatoknak a táplálék (*CRLT/N, Charles River, Magyarország*) és az ivóvíz *ad libitum*, rendelkezésre állt. A kezeléseket megelőzően az állatokat két héten át kondicionáltuk (kísérleti körülményekhez és a személyekhez való habituálódás biztosítása okán). A Kísérleti munkákba bevont állatokkal végzett kutatásokat a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével, a laboratóriumi állatokra, valamint a kísérleti eljárásokra vonatkozó jogszabályok tiszteletben tartása mellett végeztük.

## 7.4 Statisztikai analízis

Experimentális vizsgálataink eredményeinek elemzéséhez IBM SPSS Statistics (Version 25, IBM Corp. Armonk, NY, USA) programcsomagot használtunk. A viselkedési tesztekben származó adatok vizsgálatához ANOVA módszert alkalmaztunk és Fisher-féle LSD eljárással hasonlítottuk össze (OF, EPM esetén), vagy Kruskal-Wallis nem-paraméteres módszerrel, valamint Mann-Whitney U-tesztet (RI) alkalmaztunk. A plazmából és szérumból, valamint a receptor vizsgálatokból származó mért adatainkat is ANOVA módszerrel és Fisher-féle eljárással elemeztük. Eredményeinket  $\text{mean} \pm \text{standard error of mean}$  (S.E.M.) formában tüntettük fel az eredmények fejezetben. Az alkalmazott módszerek szignifikancia szintje  $p < 0,05$  volt. A különböző  $[K^+]$  kezelések normál adenohipofízisre és prolaktinomás adenohipofízisre gyakorolt hatásainak statisztikai elemzéséhez ismételt méréses ANOVA módszert használtunk: normál AdH és PRL-OMA ACTH szekréció, valamint normál AdH és PRL-OMA PRL release vonatkozásában ( $p < 0,001$ ). A prezentált adatokat SAS 9.2 software segítségével készítettük (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

A különböző mClB kezelési dózisok (0,1; 1,0 és 10  $\mu\text{g}/\text{ttg kg}$ ), és uron ágensek (PU, MU, DU) átlagértékeinek kontroll csoporthoz való viszonyának statisztikai elemzéséhez kétszemponos ANOVA-t futtattunk le (hormon elválasztások: ACTH, AVP, OT változókra). Mindhárom változó (mClB dózis,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependens aktivitás, időtartam) tekintetében, a kétszemponos ANOVA módszerrel szignifikáns eredményeknél további post hoc teszteket használtunk.

## 7.5 Betegek és alkalmazott klinikai módszerek

### 7.5.1 Esettanulmány 1

A vazospazmus *in vivo* humán klinikai vizsgálata egy 81 éves férfi betegen történt, aki non-ST elevációs miokardiális infarktus (NSTEMI) diagnózisával és vezető



tüneteivel sürgősséggel jelentkezett ellátásra. Anamnéziséből kiemelendő a *magasvérnyomás* betegség és az *aktív dohányzás*. A koszorúerek angiográfiás vizsgálata GE Healthcare Innova 2100 IQ Cardiovascular Imaging típusú készülékkel történt, jobb a. radialis behatolásból, lokális anesztéziában felvezetett 6F 3.5 JL Launcher (Medtronic Inc, Minneapolis, MN, USA) katéterrel 10.000 NE NaHeparin arteriális adását követően. Az angiográfiás vizsgálatához Iomeron 350 mg I/ml (Bracco Imaging S.p.A.) kontrasztanyag került felhasználásra. A koszorúerek funkcionális - fractional-flow-reserve (FFR) – vizsgálata PressureWire™ Certus™ (St. Jude Medical) dróttal zajlott 200µg nitrát és 240µg adenzin ic. bolus adásával. A koszorúerek optikai koherencia tomográfiás (OCT) vizsgálata Dragonfly™ katéterrel (St. Jude C7-XR konzol) történt. A spasztikus érszakasz 3,5x18mm Integrity Resolute (Medtronic Ireland) koronáriás sztenttel került áthidalásra [227].

### 7.5.2 Esettanulmány 2

A szinusz Valsalva aneurizma *in vivo* humán vizsgálata 56 éves férfi betegen történt, aki először NSTEMI, később instabil angina tünetei miatt sürgősséggel jelentkezett ellátásra. Anamnéziséből kiemelendő, hogy egy hónappal korábban elszenvedett balesetből származó bordatöréssel járó mellkasi trauma, valamint azt követően mellkasfali tályogképződés és szepszis alakult ki. A koszorúerek és aortagyök angiográfiás vizsgálata GE Healthcare Innova 2100 IQ Cardiovascular Imaging készülékkel, jobb a. radialis behatolásból, lokális anesztéziában felvezetett 5F pigtail és 6F 3.5 JL Launcher (Medtronic Inc, Minneapolis, MN, USA) katéterekkel történt 10.000 NaHeparin ic. bolus adását követően. Az angiográfiás vizsgálatához Iomeron 350 mg I/ml (Bracco Imaging S.p.A.) kontrasztanyagot használtunk. A koszorúerek funkcionális (FFR) vizsgálata PressureWire™ Certus™ (St. Jude Medical) dróttal zajlott 180µg/kg/min adenzin iv. infúziójával elért maximális hiperémiás állapot elérését követően. A koszorúerek intravaszkuláris ultrahang vizsgálata Eagle Eye® Gold katéterrel (s5™ Imaging System, Volcano Co., San Diego, CA, USA) történt. A komprimált érszakasz 5 × 25 mm, Multi-Link Ultra (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) koronáriás sztent beültetésével volt kezelve. A szinusz Valsalva aneurizma és koszorúerek non-invazív CT angiográfiás vizsgálata GE Revolution 64 szeletes és Philips AI 256 szeletes multi detektoros spirál CT készülékekkel zajlott [228].

## 8 Eredmények

Az eredmények interpretálása a célkitűzési strukturának megfelelően történik.

A disszertáció célkitűzésében (1. a, pont) megjelölt kísérleti modellkialakításnál az *in vivo* expozíciós vizsgálatokhoz csecsemő gyomorszondát alkalmaztam, mely lehetővé tette a hatóanyag standardizált gasztrointesztinális bejuttatását.

*In vitro* modellekként primer, egyrétegű (monolayer), konfluens sejtkultúrákat alakítottunk ki (adenohipofízis, prolaktinómás adenohipofízis, neurohipofízis szövetmintákból, steril, standard körülmények között), amelyek viabilitási és funkcionális standardizálását a hormontartalom és elválasztás alapján végeztük. A kísérleteknél alkalmazásra kerülő kezelési időtartamok kinetikai vizsgálatokkal kerültek beállításra.

Az *in vivo*, féléven át szubkután beültetett öszttron-acetát kezeléssel indukált prolaktinómás adenohipofízis jelenlétét a plazma PRL szintek meghatározásával kontrolláltuk (1. táblázat).

	plazma PRL szint (ng PRL/ml plazma)	
n = 10	Kezeletlen Wistar ♀ patkány	Kezelt Wistar ♀ patkány
	2,9925±0,11	7,3475±0,07*

**1. táblázat** *In vivo* öszttron-acetáttal kezelt Wistar ♀ patkányok PRL szintjének változása a féléves kezelés végén

(n=10/csoport, az adatok ANOVA módszerrel elemezve, szignifikancia szintek (\*p<0,001, a kontrollokhoz képest megadva, átlag±S.E.M.)

A prolaktinómás adenohipofízisből készült sejtkultúrák (PRLOMA) alap PRL elválasztását is követtük (2. táblázat).

	PRL elválasztás (ng PRL/mg protein)	
n=10		
alap szintek	AdH	PRLOMA
	7,13±0,04	17,14±0,02*

**2. táblázat** A normál AdH és PRLOMA sejtkultúrák PRL elválasztása *in vitro*

(n=10/csoport, az adatok ANOVA módszerrel elemezve, szignifikancia szintek (\*p<0,001, a kontrollokhoz képest megadva, átlag±S.E.M.)

A kezelések során alkalmazni kívánt szubtoxikus dózisok beállítását a toxicitást jelző májenzimek detektálásával követtük. A 3. és 4. táblázatban prezentált mérési adatok szerint a kísérleteknél használt dózisok esetén az adott májenzimek a normál tartományban maradtak, noha modulálciójuk megfigyelhető.

(NE/l)		Kísérleti csoportok (NE/l)			
normál tartomány		Kontroll	1µg/ttg kg mClB-30	1µg/ttg kg mClB-60	1µg/ttg kg mClB-90
<b>SGOT</b>	30 – 250	127,88±2,83	146,46±2,03 <sup>A</sup>	155,16±3,98 <sup>B</sup>	125,68±3,57
<b>SGPT</b>	50 – 200	54,55±2,09	57,86±1,94	58,30±1,57	50,82±2,26
<b>GGT</b>	2 – 20	3,44±0,07	3,91±0,09	4,37±0,58 <sup>A</sup>	3,67±0,07

**3. táblázat** A mClB (mix-klórbenzol: 1µg/ttg kg) expozíciók hatása ♂ Wistar patkányok szérum májenzimeire

(n=10/csoport, az adatokat ANOVA módszerrel a szignifikancia szinteket (A:  $p<0,005$ , B:  $p<0,001$ ) a kontrollokhoz képest adtuk meg, átlag±S.E.M.)

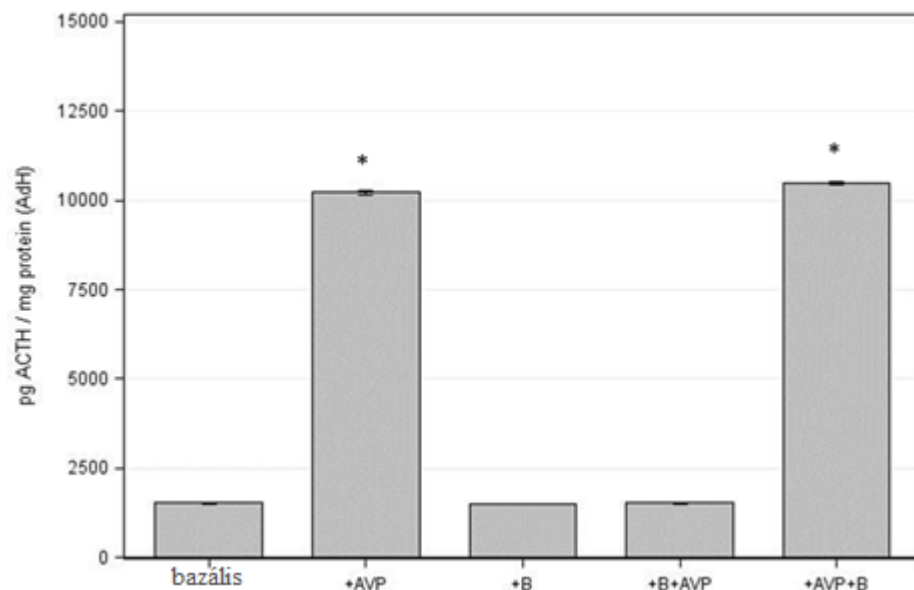
(NE/l)		Kísérleti csoportok (NE/l)			
normál tartomány		Kontroll	10µg/ttg kg mClB-30	10µg/ttg kg mClB-60	10µg/ttg kg mClB-90
<b>SGOT</b>	30 – 250	127,88±2,83	157,21±2,03 <sup>A</sup>	175,17±3,98 <sup>A</sup>	183,65±3,57 <sup>A</sup>
<b>SGPT</b>	50 – 200	54,55±2,09	67,83±1,94 <sup>A</sup>	79,37±1,57 <sup>A</sup>	97,36±2,26 <sup>A</sup>
<b>GGT</b>	2 – 20	3,44±0,07	5,94±0,09 <sup>A</sup>	9,21±0,58 <sup>A</sup>	11,60±0,07 <sup>A</sup>

**4. táblázat** A mClB (mix-klórbenzol: 10µg/ttg kg) expozíciók hatása Wistar ♂ patkányok szérum májenzimeire

(n=10/csoport, az adatokat ANOVA módszerrel a szignifikancia szinteket (A:  $p<0,005$ ) a kontrollokhoz képest adtuk meg, átlag±S.E.M.)

A 10. ábra adataiból látható, hogy az AVP aktivált ACTH elválasztás szabályozásban a hormon release fokozódott. A kortikoszteron (+B) hozzáadását követően csökkent modulációt tapasztaltunk az ACTH elválasztásban. A kombinált kezeléseknél a kortikoszteron megelőző adását követő AVP jelenlét során nem tapasztaltunk a kontrollhoz viszonyítottan eltérést az ACTH release-ben. Viszont az AVP jelenlétében

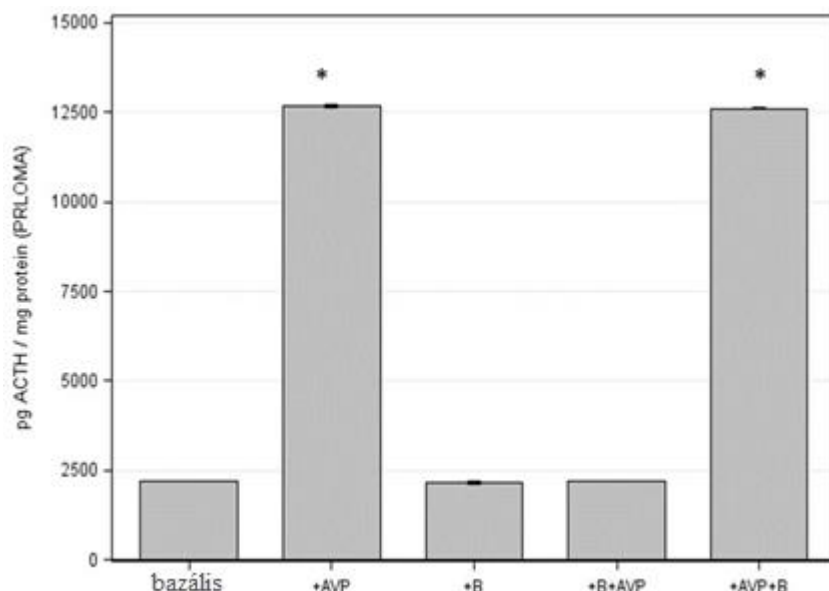
kísérleti protokoll szerint hozzáadott kortikoszteron jelenlétében erősen emelkedett az ACTH elválasztás.



**10. ábra** A hipofízis-mellékvesekéreg tengely *in vitro* szabályozási modell ACTH release vizsgálata egészséges patkány AdH-ban

( $n=8$ , átlag $\pm$ S.E.M, bazális: kontroll csoport, AVP: 8-arginin vazopresszin, B: kortikoszteron  $*p<0,001$  a basal relációjában)

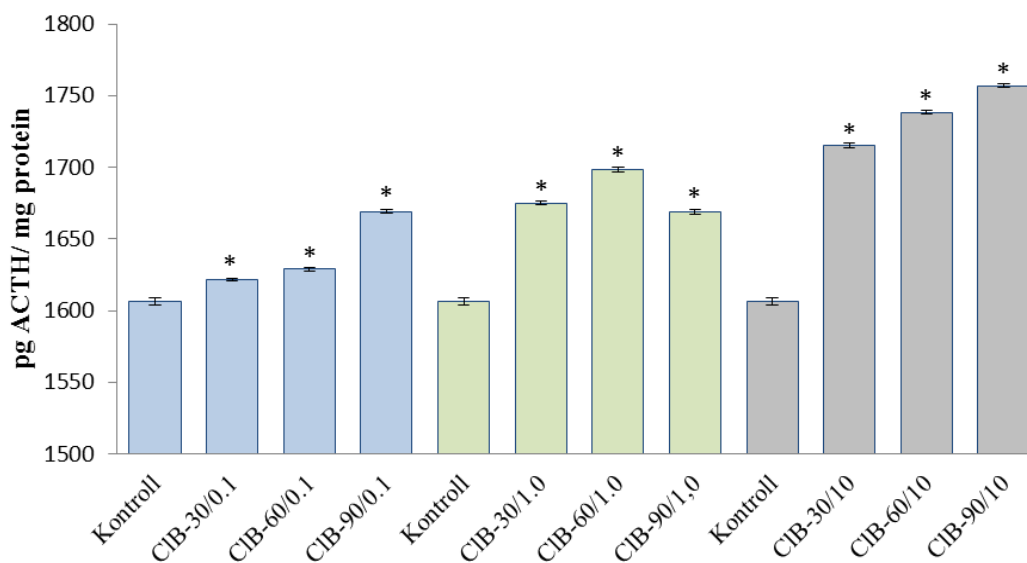
A 11. ábra az *in vitro* PRLOMA modell hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HMT) regulációs ciklusát mutatja be az ACTH elválasztás tekintetében. A release aktiváció az AVP, a gátlás kortikoszteron (B) jelenlétében észlelhető.



**11. ábra** A hipofízis-mellékvesekéreg tengely *in vitro* szabályozási modell: ACTH release vizsgálata PRLOMA-ban

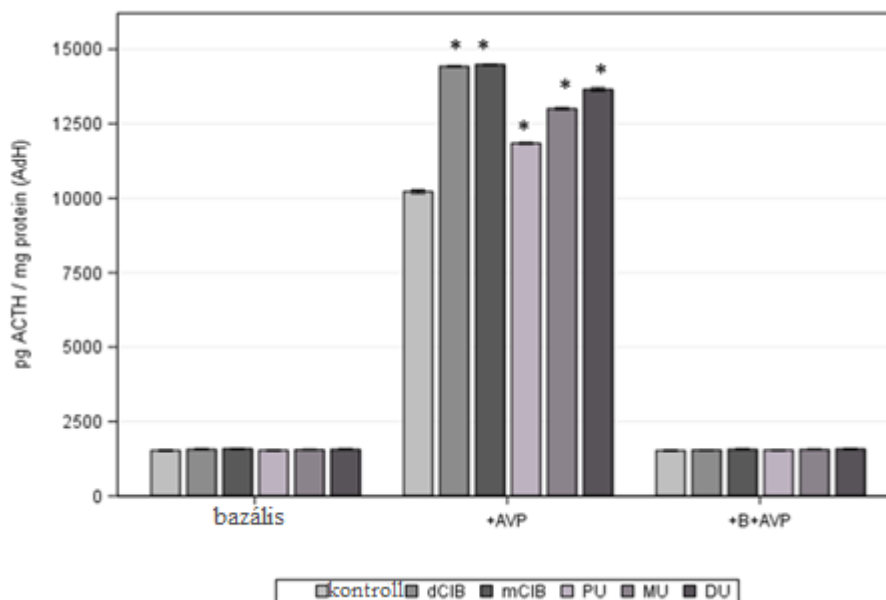
( $n=8$ , átlag $\pm$ S.E.M, bazális: kontroll csoport, AVP: 8-arginin vazopresszin, B: kortikoszteron  $*:p<0,001$  a basal relációjában)

A 12. ábra szerint az *in vivo* ClB (mix-klórbenzol) kezelések dózisainak emelkedése szignifikánsan fokozta az AdH modellekben az ACTH elválasztását, amely a kezelési időtartamok növekedésével egyre fokozódott.



### 12. ábra Klórbenzol *in vivo* kezelések hatása az ACTH elválasztásra AdH modellben

( $\text{átlag} \pm \text{S.E.M}$ ,  $n=10/\text{kísérleti csoport}$ ,  $^* : p < 0,001$ , szignifikancia érték meghatározása ANOVA módszerrel, a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1  $\mu\text{g}/\text{ttg kg}$  és 1,0  $\mu\text{g}/\text{ttg kg}$  és 10,0  $\mu\text{g}/\text{ttg kg}$  dózisú mix-klórbenzol (CIB) expozíciós kezelési minták kerültek feltüntetésre.)

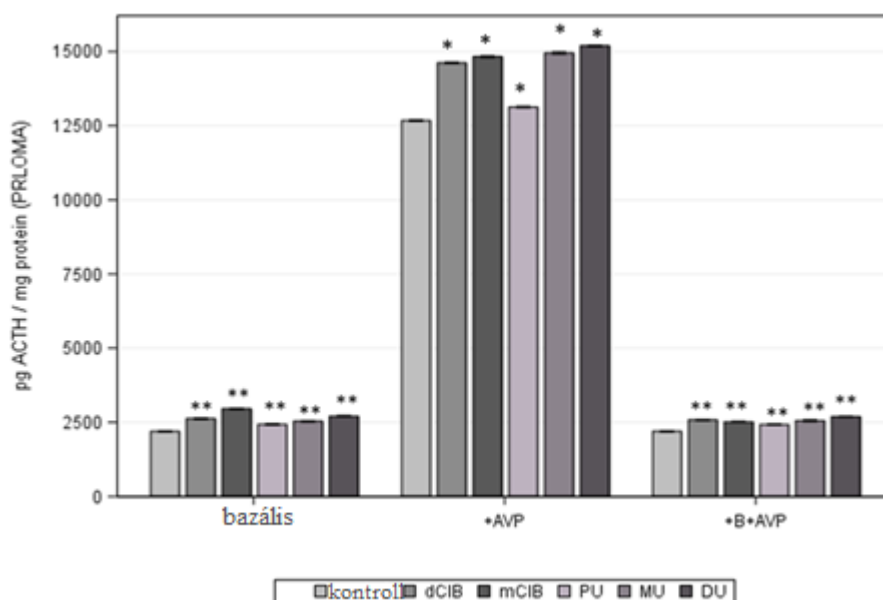


### 13. ábra Klórbenzol és fenilurea kezelések hatása ACTH elválasztásra AdH modellben

(kortikoszteron [B]: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; [AVP]: (8-arginin vazopresszin):  $10^{-6}$  M; + B + AVP: a B kombinált kezelésben az AVP adagolása 20 perccel korábban történt; [dCIB] (1,4-diklór-benzol): 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; [mCIB] (klórbenzol keverék): 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; [PU] (fenuron):  $10^{-6}$  M; [MU] (monuron):  $10^{-6}$  M; [DU] (diuron):  $10^{-6}$  M) AdH: adenohipofízis sejtkultúra; ACTH: adrenokortikotrop hormon. Az ágensek hatáseredményei szignifikánsan különböznek a + AVP mintákétól /  $p < 0,001$ ,  $\text{átlag} \pm \text{S.E.M}$ )

A 13. ábra szerint, az alkalmazott hatóanyagok (dCIB, mCIB, PU, MU, DU) által kiváltott ACTH release-nél a kontrollhoz viszonyítottan az ágensek önmagukban nem módosítják értékelhető módon az ACTH felszabadulást. Az AVP aktivált ACTH felszabadulást viszont szignifikánsan megemelték. A gátlási mechanizmust szimuláló modellelemnél (+ B majd + AVP) nem detektáltunk eltéréseket.

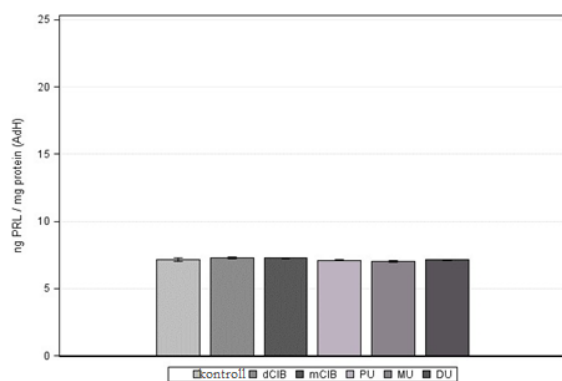
A 14. ábra az expozíciós hatóanyagok (dCIB, mCIB, PU, MU, DU) ACTH release-t érintő hatásait mutatja a kontrollhoz viszonyítottan PRLOMA modellben. Látható, hogy az ágensek már önmagukban modulálják a PRLOMA alap ACTH elválasztását. Az AVP indukálta, megemelkedett ACTH felszabadulást szignifikáns mértékben emelték a vizsgált ágensek. A kortikoszteron, majd AVP kombinált kezelés hatására is megváltozott az ACTH hormon elválasztás.



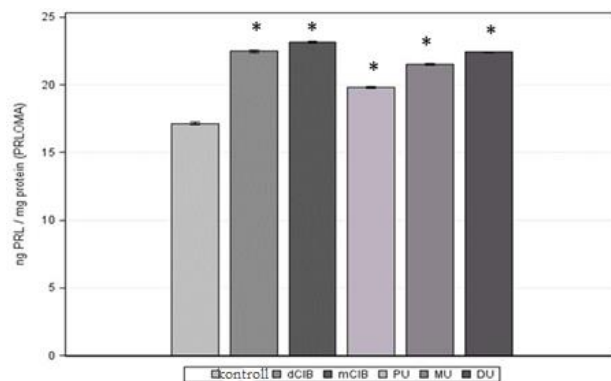
**14. ábra** Klórbenzol és fenilurea kezelések hatása ACTH elválasztásra PRLOMA modellben

(kortikoszteron [B]: 1 µg/ml; [AVP]: (8-arginin vazopresszin): 10<sup>-6</sup> M; + B + AVP: a B kombinált kezelésben az AVP adagolása 20 perccel korábban történt; [dCIB] (1,4-diklór-benzol): 0,1 µg / ml; [mCIB] (klór-benzol keverék): 0,1 µg/ml; [PU] (fenuron): 10<sup>-6</sup> M; [MU] (monuron): 10<sup>-6</sup> M; [DU] (diuron): 10<sup>-6</sup> M; PRLOMA: prolaktinómás-adenohipofízis sejt kultúra; ACTH: adrenokortikotrop hormon. Az ágensek hatáseredményei szignifikánsan különböznek a + AVP mintákétól \*/p <0,001/, a bazal és kombinált kontrolltól való eltérések \*\* / p <0,01/, átlag±S.E.M)

A 15. ábrán az egészséges AdH és PRLOMA sejt kultúra modellekkel tanulmányozott fenilurea ágensek, dCIB, valamint mix-klórbenzolok hatásainak vizsgálati eredményei láthatók. Az AdH modellnél a PRL alap release-ben a kezeletlen és kezelt csoportok között nem detektáltunk eltérést. A PRLOMA esetén a PRL bazális elválasztását már erősen zavarták a kísérleti ágensek.



a,

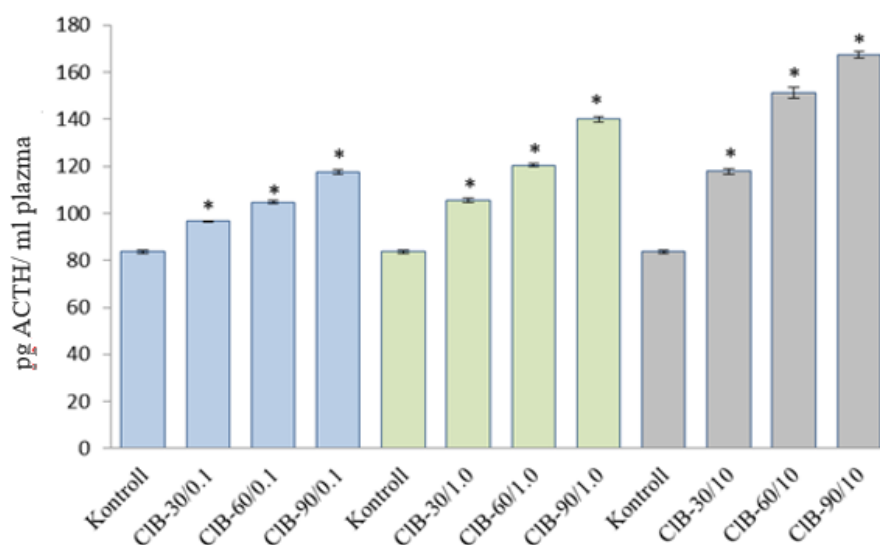


b,

**15. ábra** Fenilurea és klórbenzol *in vitro* kezelések hatása a PRL elválasztásra az AdH (a) és PRLOMA (b) modellekben

( $n=12$ , átlag [PRL]  $\pm$  S.E.M.; [dCIB]: 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ; [mCIB] (klórbenzol mix): 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ; [PU] (fenuron)  $10^{-6}$  M; [MU] (monuron):  $10^{-6}$  M; [DU] (diuron)  $10^{-6}$  M. PRLOMA-ban minden kezelési csoportban az elválasztott hormontartalom szignifikánsan különbözött ( $p<0.001$ ) a kontrolltól.)

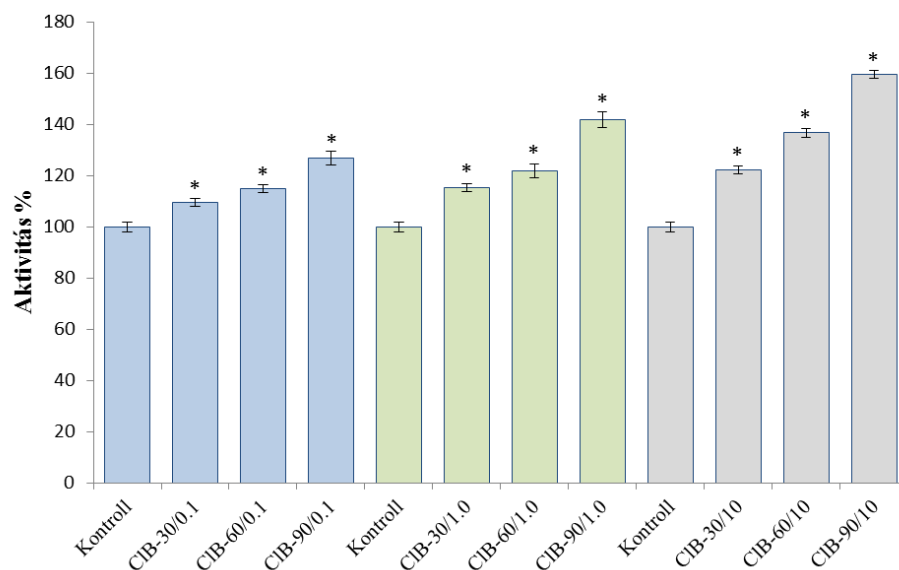
A 16. ábra bemutatja az *in vivo* CIB-lal kezelt Wistar törzsű patkányok vérérszérumainak ACTH tartalmát a kezelési dózisoknak és időtartamoknak megfelelően. Látható, hogy a CIB kezelések mind dózis, mind időfüggő módon emelték a szérum ACTH koncentrációit a kontroll csoporthoz viszonyítva.



**16. ábra** Az *in vivo* klórbenzol kezelések hatása a ♂ Wistar patkányok plazma ACTH mennyiségére

(Átlag  $\pm$  S.E.M.,  $n=10$ /kísérleti csoport, \*:  $p<0.001$ , szignifikancia érték meghatározása ANOVA módszerrel, az adatok a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1  $\mu\text{g/ttg kg}$  és 1,0  $\mu\text{g/ttg kg}$  és 10,0  $\mu\text{g/ttg kg}$  dózisú mix-klórbenzol (CIB) expozíciós kezelések szérum mintáinak ACTH tartalmaiként kerültek feltüntetésre.)

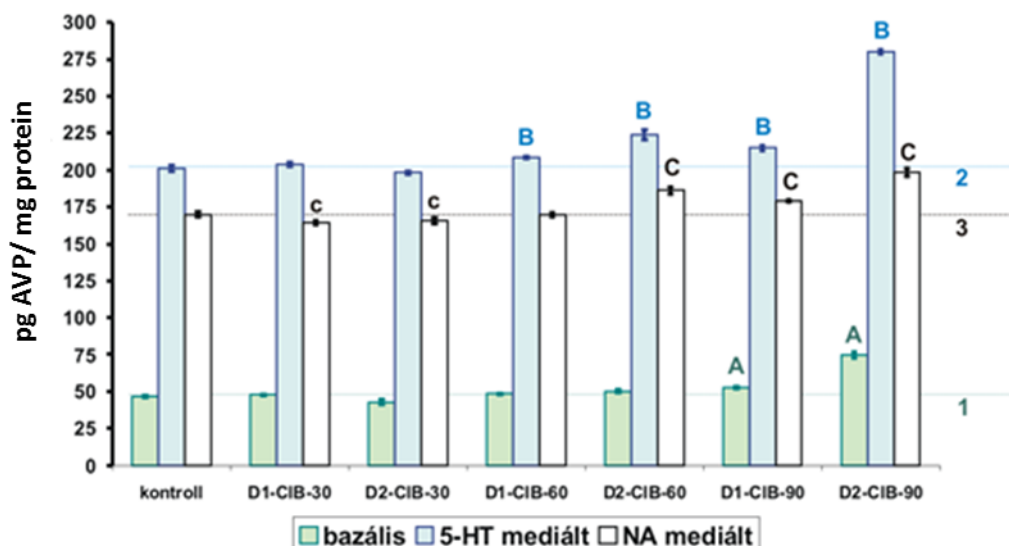




**17. ábra** ClB kezelések hatása az adenohipofízis sejtek nonmitokondriális  $Mg^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitásainak alakulására.

(Átlag $\pm$ S.E.M.,  $n=10$ /kísérleti csoport, \*:  $p<0,001$ , szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel határoztuk meg, az adatokat a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1  $\mu g/ttg\ kg$ , és 1,0  $\mu g/ttg\ kg$  és 10,0  $\mu g/ttg\ kg$  dózisú mix-klórbenzol (ClB) expozíciós kezelési minták vonatkozásában tüntettük fel.)

A 17. ábrán a  $Mg^{2+}$ -függő ATPáz aktivitás a kezeletlen kontroll csoport által produkált enzimaktivitással került összehasonlításra, így azt 100%-nak tekintettük. Az 0,1  $\mu g/ttg\ kg$  dózisú ClB kezelés a  $Mg^{2+}$ -függő ATPáz aktivitást növelte ( $109,5 \pm 1,55$ ;  $114,9 \pm 1,59$ ;  $126,9 \pm 2,66\%$ , átlag $\pm$ S.E.M.,  $p<0,001$ ). Az 1,0  $\mu g/ttg\ kg$  dózisú ClB mix kezelés hatására az idő függvényében a  $Mg^{2+}$ -függő ATPáz aktivitása szignifikánsan tovább fokozódott ( $115,3 \pm 1,55$ ;  $121,9 \pm 2,63$ ;  $141,9 \pm 3,09\%$ , átlag $\pm$ S.E.M.,  $p<0,001$ ). Az enzimaktivitás karakterisztikus emelkedését ( $122,2 \pm 1,66$ ;  $136,6 \pm 1,66$ ;  $159,4 \pm 1,51\%$ , átlag $\pm$ S.E.M.,  $p<0,001$ ) detektáltuk az 10,0  $\mu g/ttg\ kg$  dózisú kezelésnél.



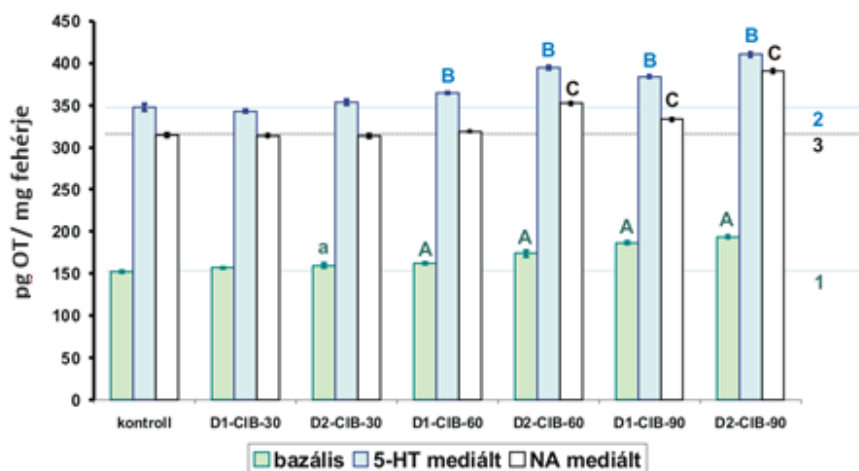
**18. ábra** *In vivo* mCIB kezelések hatása a NH-bazális és monoamin mediált AVP elválasztására

(Átlag $\pm$ S.E.M,  $n=5 \times 10$  sejtkultúra/kísérleti csoport, a sejtkultúrák elválasztott AVP mennyisége pg hormon/mg fehérjében kifejezett. A bazális (nem monoamin aktivált) release (zöld oszlop). Az **5-HT mediált**: 1 órás  $10^{-6}$  M 5-HT kezelt (kék oszlop). **NA mediált**: 1 órás  $10^{-6}$  M NA kezelt (fehér oszlop). A szignifikancia: **A**:  $p < 0,05$ : az alapszintre; **B**:  $p < 0,01$ : az 5-HT mediált; **C**:  $p < 0,001$ , **c**:  $p < 0,05$ : a NA mediált relációjában megadottak. A kontrolloknál a monoaminok nélküli bazális szekréció zöld, 1-es jelzésű vonallal; a 5-HT hozzáadást követő szekréció kék, 2-es jelzésű vonallal; a NA hozzáadást követő szekréció fekete, 3-as jelzésű vonallal jelölt. A D1 dózis: 0,1  $\mu$ g/ttg kg/nap mixCIB; D2 dózis: 1,0  $\mu$ g/ttg kg/nap mix-klórbenzol (CIB),  $t = 30, 60, 90$  nap.)

A 18. ábra a monoamin (NA, 5-HT) aktivált AVP elválasztást mutatja a klórbenzol kezelések hatására. Látható, hogy a szabályozási ciklusban a monoaminok fokozták az AVP elválasztást. Az 5-HT esetében a 60. kezelési naptól találtunk szignifikáns AVP exocitotikus aktivitási eltéréseket mindkét alkalmazott dózis esetén. Ugyan a D2 dózissal már 30. kezelési naptól kimutatott a moduláció. A NA aktivált AVP hatást a CIB-k a következők szerint változtatták meg: a 30. kezelési napon csökkentett, majd a 60. kezelési napon a D2-ben emelkedett, utána a 90. kezelési napon már mindkét dózisban fokozott AVP release-t okoztak. Ugyanakkor, az ábráról leolvasható a CIB kezelések időtartamokkal és dózisokkal jellemzett hatása is. A D1 dózis csak a 90 napon mutat **A**:  $p < 0,05$  szignifikáns emelkedést a NA mediált AVP elválasztásban. Viszont a D2 dózissal a 30. napon csökkent, majd a 90. napon fokozott AVP elválasztást észleltünk.

A 19. ábra a CIB hatását mutatja az OT elválasztásra NH modellben, monoamin aktivált rendszerben. Az 5-HT aktivált OT elválasztást a 60. kezelési naptól szignifikánsan módosította mindkét dózisban a CIB. A NA aktivált vizsgálati rendszerben

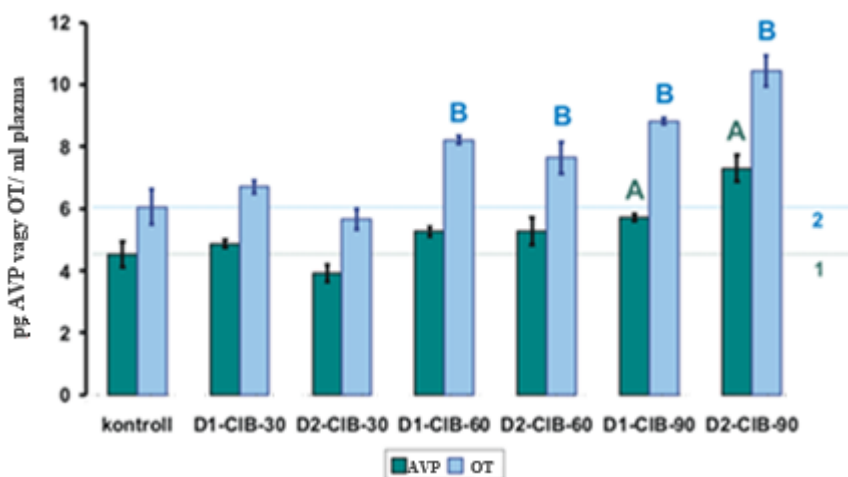
a ClB hatást a D1 dózisban csak a 90. kezelési napon, a D2 dózisban már a 60. kezelési naptól detektáltuk.



**19. ábra** Az *in vivo* mCIB kezelés hatása a NH bazális és monoamin mediált OT elválasztására

(Átlag $\pm$ S.E.M,  $n=5 \times 10$  sejtkultúra/kísérleti csoport, a sejtkultúrák OT szintjei pg hormon/mg fehérjére vonatkoztatva. **Bazális** (nem monoamin kezelt) release (zöld oszlop). **5-HT mediált**: 1 órási  $10^{-6}$  M 5-HT-aktivált (kék oszlop). **NA mediált**: 1 órási  $10^{-6}$  M NA-aktivált (fehér oszlop). A szignifikancia A:  $p < 0.05$  a:  $p < 0.005$ : az alapra; a B:  $p < 0.001$ : a 5-HT mediáltra, C:  $p < 0.001$ : a NA mediáltra megadott, a saját kontrolljaik relációiban. A kontroll azaz, az alap release-t zöld, 1-es jelű vonallal; a 5-HT hatást kék, 2-es jelű vonallal; a NA hatást fekete, 3-as jelű vonallal jelöltük. A D1 dózis: 0,1  $\mu$ g/ttg kg/nap mix-klórbenzol (CIB); D2 dózis: 1,0  $\mu$ g/ttg kg/nap mix CIB,  $t = 30, 60, 90$  nap.)

Az *in vivo* CIB kezelések hatására jól láthatóan megváltoztak a plazma AVP és OT értékek a 20. ábra adatai szerint. Modulációt már a 30. kezelési naptól mindkét dózis (D1 és D2) esetén mértünk. Szignifikáns eltéréseket D2 dózissal a 60. kezelési naptól, D1 dózissal pedig a 90. kezelési naptól tapasztaltunk.

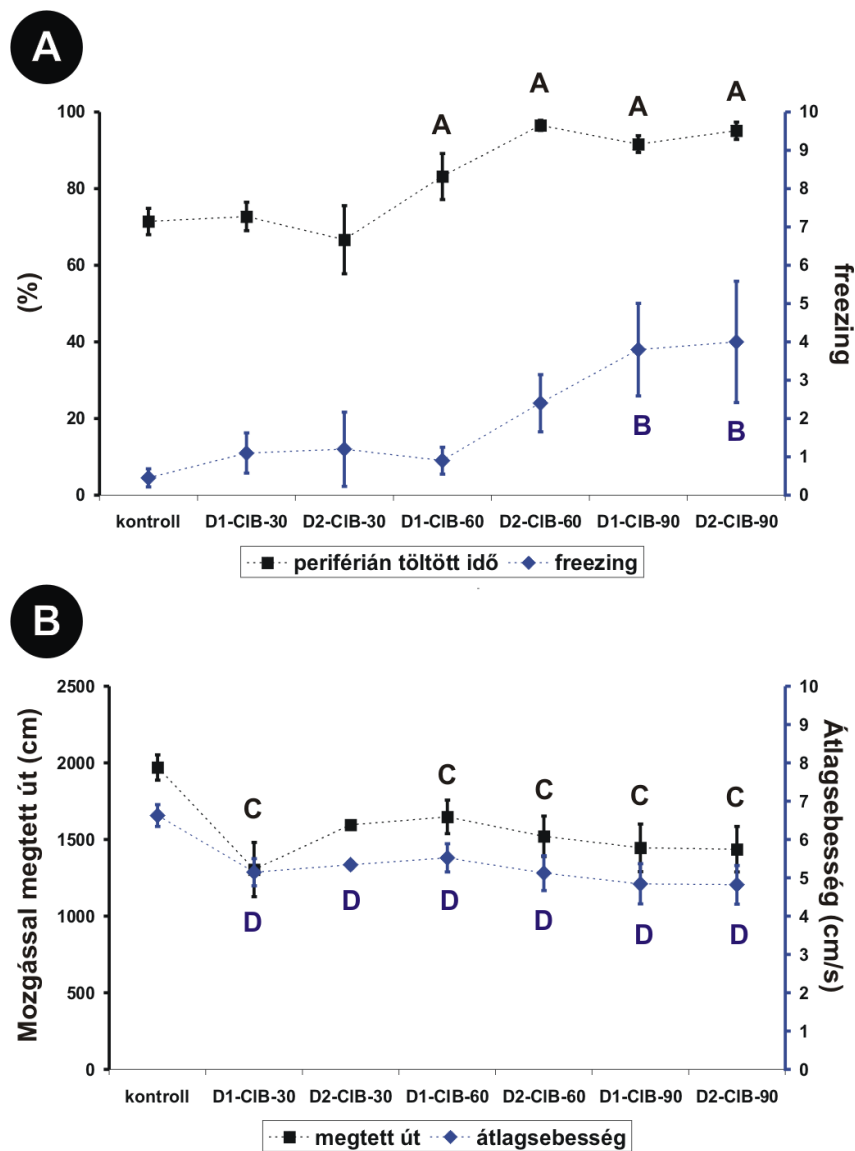


**20. ábra** *In vivo* CIB kezelések hatása a plazma AVP és OT koncentrációira

(Átlag $\pm$ S.E.M.,  $n=10$ /kísérleti csoport, az eredmények: pg hormon/ml plazma értékekben kerültek feltüntetésre. Az AVP (A:  $p < 0.05$ ), és az OT (B:  $p < 0.05$ ) szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel a

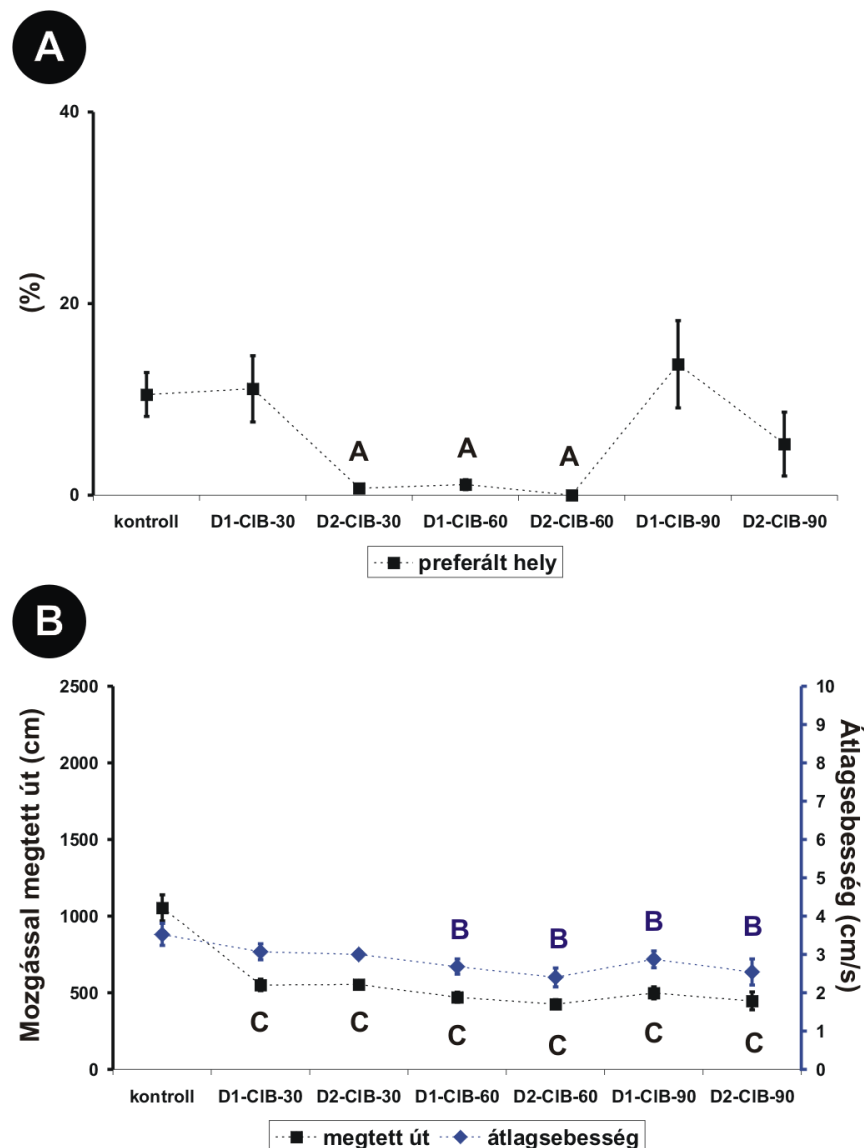
*kontroll csoport és a 30, 60, és 90 napos, 0,1 µg/ttg kg (D1) és 1 µg/ttg kg (D2) dózisú mix-klórbenzol (ClB) kezelt modellállatok esetén adtuk meg. A plazma AVP (zöld oszlopok), a plazma OT (kék oszlopok). Az AVP és az OT értékek közös y tengelyhez rendelték. A könnyebb áttekintés érdekében a kontroll csoportok alap AVP elválasztás koncentrációt zöld, 1-es jelzésű; a bazális OT release koncentrációt kék, 2-es jelzésű vonallal jelölték.)*

A 21. ábra az *in vivo* ClB kezelések OF rendszerű vizsgálatát mutatja a szorongásos és a lokomotoros aktivitás vonatkozásában. A szorongást meghatározó periférián töltött idő mindkét dózisonál már a 60. kezelési naptól szignifikáns eltérést mutatott. Ugyanakkor a D2 dózisonál már a 30. kezelési napon is rögzítettünk modulációkat. A freezing-ek tekintetében a 90. kezelési naptól volt szignifikáns az eltérés, noha a modulációk már a 30. kezelési naptól megjelentek. A lokomóciót képviselő megtett út és átlagsebesség vizsgálatánál a 60. kezelési naptól mindkét dózisban szignifikáns eltéréseket rögzítettünk. Továbbá a D1 dózisban a lokomóciót jelző viselkedéselemek a 30. kezelési napon már szignifikánsan eltértek a kontrolltól, a D2 esetén a változás még nem volt szignifikáns.



**21. ábra** *In vivo* ClB kezelések hatása Wistar patkányok OF tesztekkel követett szorongásos és exploratív viselkedésére

(Átlag $\pm$ S.E.M.,  $n=10$ /kontroll vagy  $n=10$ /expozíciónak kitett csoportok. A kontroll és az 0,1  $\mu$ g/ttg kg (D1) és 1  $\mu$ g/ttg kg (D2) dózisú mix-klórbenzol (ClB) expozíciós hatások eltéréseit szignifikanciákkal **A**, **B**, **C** vagy **D** ( $p<0,05$ ) jelöltük és ANOVA módszerrel, Fisher-féle eljárás segítségével elemeztük. Az ábra **A** része a szorongást jelző viselkedési elemeket mutatja, az ábra **B** része a lokomóciót érintő változásokat. **A** rész: periférián eltöltött idő a teljes vizsgálati idő %-ában kifejezve (fekete pontozott vonal/négyzet, a bal oldali y tengelyhez rendelve) és a freezing (kék pontozott vonal/rombusz, a jobb oldali, kék y tengelyhez rendelve). **B** rész: a mozgással megtett út (fekete pontozott vonal/négyzet, a bal oldali y tengelyhez rendelve) és az átlagsebesség (kék pontozott vonal/rombusz, a jobb oldali, kék y tengelyhez rendelve).



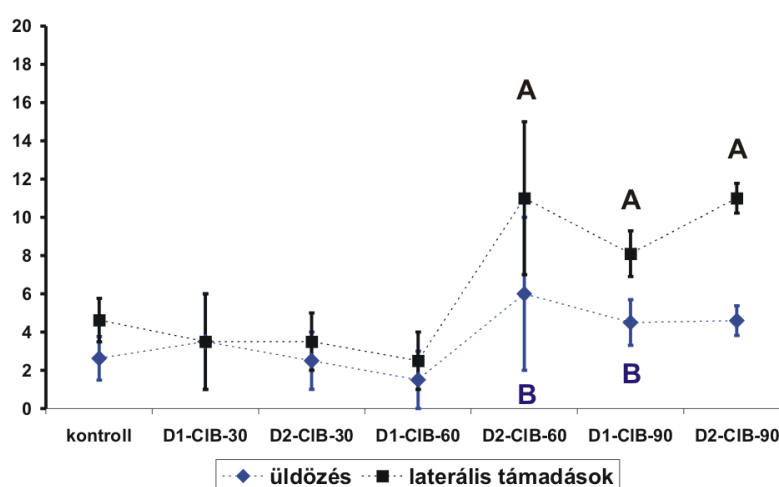
**22. ábra** Az *in vivo* CIB kezelt Wistar patkányok EPM tesztekkel követett szorongásos és exploratív viselkedése

(Átlag $\pm$ S.E.M.,  $n=10$ /kontroll vagy  $n=10$ /kezelt csoportok. A kontroll és az 0,1  $\mu\text{g}/\text{ttg kg}$  (D1) vagy 1  $\mu\text{g}/\text{ttg kg}$  (D2) dózisú mix-klórbenzol (-CIB) expozíciós csoportok szignifikancia relációi: **A**, **B**, **C** ( $p<0,05$ ) betűkkel jelöltek és ANOVA módszerrel, Fisher-féle eljárással elemeztek. Az **A** rész a szorongásos viselkedési elemeket mutatja, a **B** rész a lokomóciót jelzi. **A** rész: a nyitott karokban eltöltött idő a teljes vizsgálati idő %-ában megadva (fekete pontozott vonal/négyzet). **B** rész: a megtett út (fekete pontozott.)

A 22. ábra a szorongásos exploratív viselkedés EPM rendszerű vizsgálatát mutatja *in vivo* mCIB kezelések hatására. A szorongást (22/A ábra) itt a *preferált helyen* való tartózkodással jellemeztük. Látható, hogy a D2 dózis alkalmazásánál már 30. és a 60. kezelési napon szignifikáns volt az eltérés, ami a nagy különbséget mutatott a 90. kezelési napon is, de a magas adatszórás miatt ezt nem tekinthettük szignifikánsnak. A D1 dózissnál a 60. kezelési napon találtunk szignifikáns eltérést, ami 90. kezelési napon is erőteljes különbséget képviselt, de ebben az esetben is magas volt az adatszórás, így a statisztikai elemzés nem mutatott szignifikanciát. A 22/B ábrarészben az exploratív viselkedést

jellemző „*megtett út*” és az „*átlagsebesség*” kerültek feltüntetésre. A „*megtett út*” vizsgálati eredménye minden kutatási protokoll mintában szignifikáns eltérést mutatott. Az „*átlagsebesség*” esetén a 60. kezelési naptól mindkét dózisban szignifikáns eltéréseket detektáltunk.

A 23. ábra az *in vivo* ClB kezelések hatására kialakuló agresszív viselkedési elemeket tünteti fel. A értékelte adatok szerint, a D2 dózisban a 60. kezelési naptól, a D1 dózisban a 90. kezelési napon volt szignifikáns viselkedésemelkedés, mind az üldözések, mind a laterális támadások esetében.



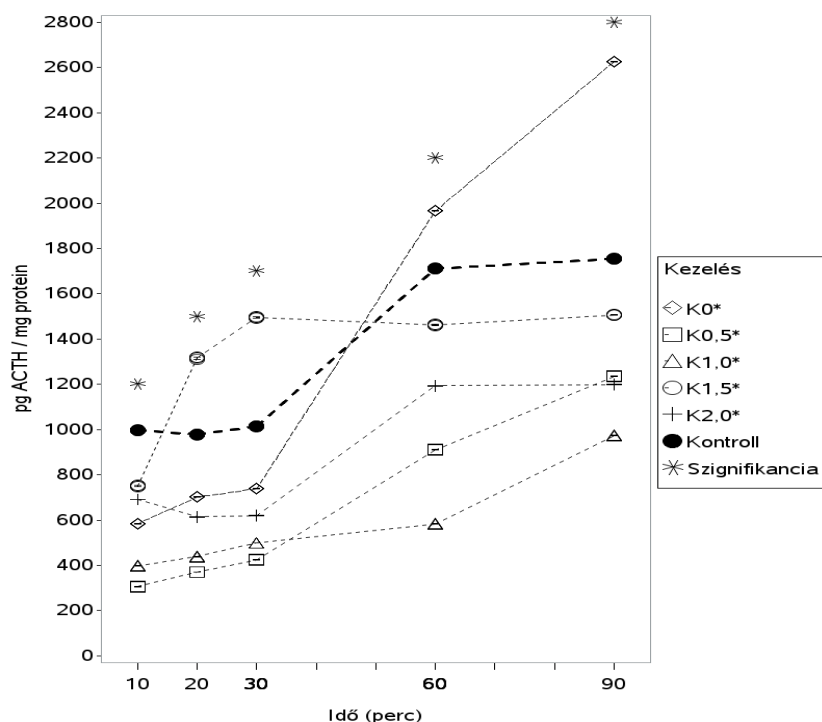
**23. ábra** *In vivo* ClB kezelés hatása a Wistar patkányok RI tesztekkel követett offenzív viselkedéselemre.

(Átlag $\pm$ S.E.M.,  $n=10$ /kontroll vagy  $n=10$ /ClB-kezelt csoportok. A kontroll és az 0,1  $\mu$ g/ttg kg (D1) és 1  $\mu$ g/ttg kg (D2) dózisú mix-klórbenzol (ClB) expozíció hatására kialakult szignifikancia **A**, **B** ( $p<0,05$ ) betűkkel jelölt. Laterális támadások száma (fekete pontozott vonal/négyzet) és üldözések száma (kék pontozott vonal/rombusz.)

A 24. ábra szerint a normál AdH kultúrák kontroll ACTH elválasztás időfüggő kinetikai karakterisztikájától eltérnek a hipokalémiás extracelluláris térben detektálható ACTH release értékek. Az extrém alacsony dózisú, 0 mM  $[K^+]$  esetén az ötven perces kezelés után emelkedik a kontroll szint fölé a hormonelválasztás. Továbbá az ACTH release kontroll szinthez viszonyított emelkedését, az 1,5 mM  $[K^+]$  koncentráció 10-50 perces kezelési időtartamban detektáltunk. A 0,5; az 1,0 mM és a 2,0 mM extracelluláris  $[K^+]$ -nál az eltérések szintén szignifikánsak, de kontrollszint alattiak a teljes kezelési periódusban. Az 25. ábrán feltüntetett PRLOMA modell kontroll ( $435,1 \pm 1,39$ ;  $536,3 \pm 3,10$ ;  $713,6 \pm 1,82$ ;  $1887,9 \pm 2,52$ ;  $2083,0 \pm 3,42$  pg hormon/mg protein; átlag $\pm$ S.E.M.)



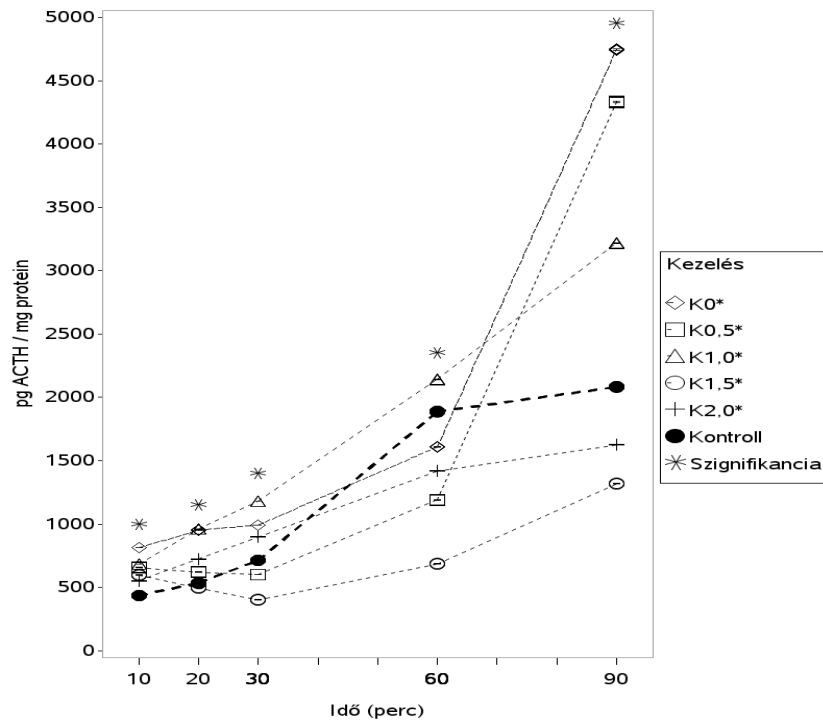
ACTH elválasztásától is szignifikánsan eltér az egészséges AdH modell ACTH release kinetikája.



**24. ábra** Eltérő extracelluláris  $[K^+]$  hatása az ACTH elválasztásra normál AdH-ban

(Átlag $\pm$ S.E.M., kontroll: fiziológiás Tyrode oldatban; sejtkultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM  $[K^+]$  (K0\*); 0,5 mM  $[K^+]$  (K0,5\*); 1,0 mM  $[K^+]$  (K1,0\*); 1,5 mM  $[K^+]$  (K1,5\*); 2,0 mM  $[K^+]$  (K2,0\*), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .)

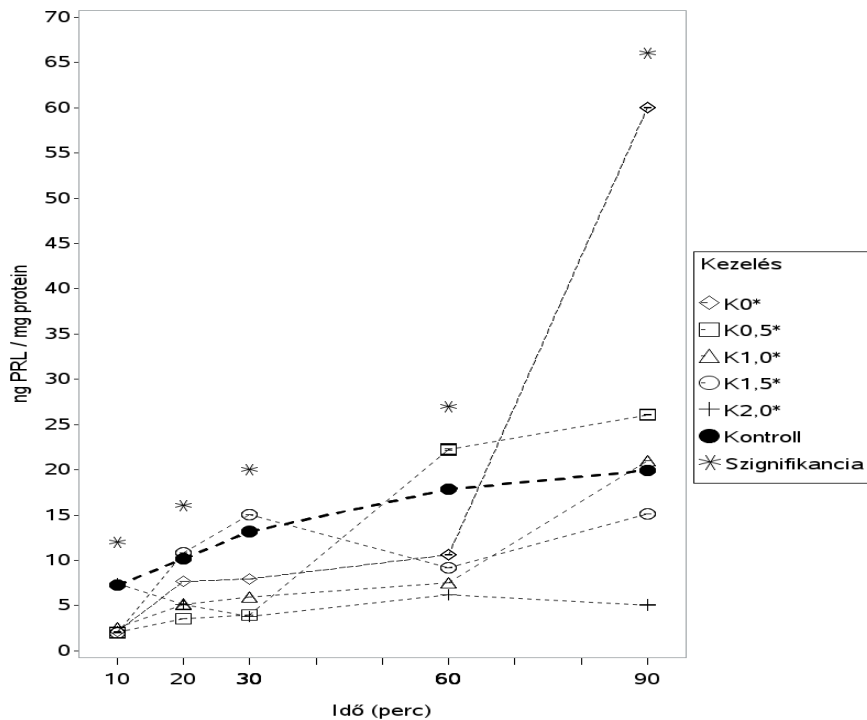
A PRLOMA modellben (25. ábra) a kontroll ACTH elválasztás karakterisztikájától szignifikánsan eltérő kinetikákat mutatnak az extracelluláris tér hipokalémiás közegeiben mért ACTH értékek. A 0 mM, a 0,5 mM és 1,0 mM extracelluláris  $[K^+]$  esetén 60 perces kezelések után már erősen emelkedett ACTH értékeket detektáltunk. A 1,5 mM és 2,0 mM extracelluláris  $[K^+]$ -nál a kezelések első harmadában volt csak diszkrét ACTH érték emelkedés.



**25. ábra** Extracelluláris  $[K^+]$  kezelések hatása az ACTH release-re PRLoma modellben

(Átlag $\pm$ S.E.M., kontroll: fiziológias Tyrode oldatban; sejtkultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM  $[K^+]$  (K0\*); 0,5 mM  $[K^+]$  (K0,5\*); 1,0 mM  $[K^+]$  (K1,0\*), 1,5 mM  $[K^+]$  (K1,5\*); 2,0 mM  $[K^+]$  (K2,0\*), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ ).

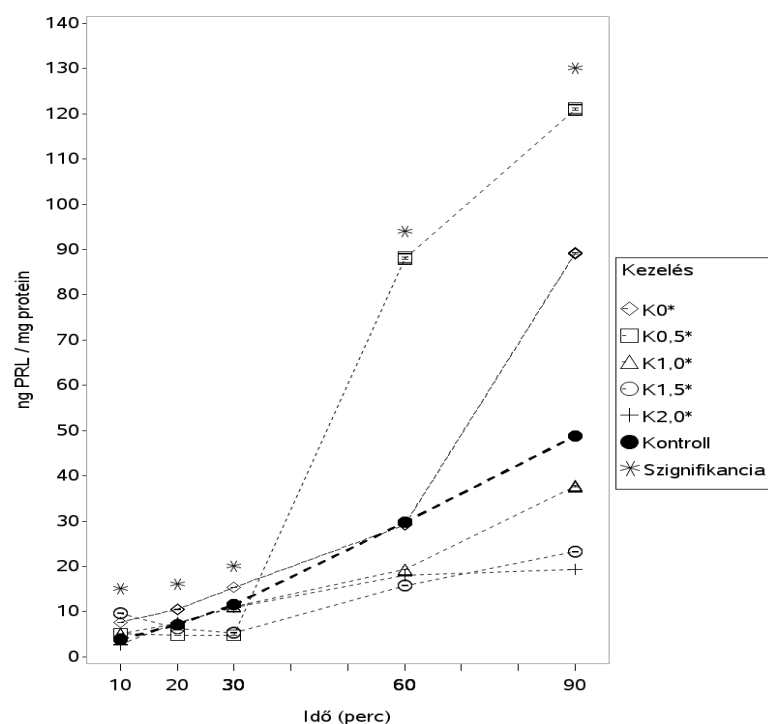
A 26. ábra alapján a normál AdH 0 mM  $[K^+]$ -val kezelt csoportjainak PRL szintje csökkent a 10., 20., 30. és 60. percben a kontrollhoz viszonyítva. Viszont a 90. percben a kezelt sejtkultúra hormonszintje karakterisztikusan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest. A 0,5 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés eredményeként az AdH sejtkultúrák PRL szekréciója erősen csökkent a kísérleti protokoll 30. percéig azonban a 60. és a 90. percben a hormonelválasztás szignifikánsan emelkedett a kontroll csoporttal összehasonlítva. Az 1,0 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés a PRL release-t szignifikánsan csökkentette, de a 90. percben a kontroll csoporthoz képest az már jelentősen emelkedett. Az 1,5 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés hatására a szekretált PRL szintje szignifikánsan csökkent, majd a 20., 30. percben fokozódott a kontroll csoporthoz lépest. A kísérlet 60., 90. percében a PRL release szignifikáns csökkenése volt tapasztalható. A 2,0 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés a PRL szekréciót a 10. percben csupán diszkrétan módosította, majd az idő függvényében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a kontroll csoporthoz viszonyítva.



**26. ábra** Extracelluláris  $[K^+]$  csökkenés hatása a PRL elválasztásra normál, primer AdH-ban

(Átlag $\pm$ S.E.M., kontroll: fiziológias Tyrode oldatban; sejtkultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM  $[K^+]$  (K0\*); 0,5 mM  $[K^+]$  (K0,5\*); 1,0 mM  $[K^+]$  (K1,0\*), 1,5 mM  $[K^+]$  (K1,5\*); 2,0 mM  $[K^+]$  (K2,0\*), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .)

A 27. ábrán a kontroll PRLOMA sejtkultúrák és a hipokalémiával extracellulárisan kezelt sejtkultúrák PRL elválasztása került feltüntetésre. A kontroll csoport adataival összehasonlítva ( $3,86 \pm 0,01$ ;  $7,11 \pm 0,02$ ;  $11,52 \pm 0,01$ ;  $29,72 \pm 0,07$ ;  $48,78 \pm 0,02$  ng PRL / mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.) a kísérlet 10., 20. és 30. percében a 0 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  hatására elválasztott PRL mennyisége emelkedett ( $7,64 \pm 0,01$ ;  $10,48 \pm 0,02$ ;  $15,32 \pm 0,05$  PRL / mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.). Ez a 60. perctől szignifikáns PRL értékelemelkedést mutatott ( $89,23 \pm 0,17$  ng PRL / mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.,  $p < 0,001$ ). A 0,5 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  expozíció a 10. percében a PRL szint minimális emelkedését okozta, amit a 20. és a 30. percben jelentős csökkenés ( $4,82 \pm 0,02$ ;  $4,73 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.,  $p < 0,001$ ) követett a kontroll relációjában. A kísérlet 60. és 90. percében a PRL szint extrém emelkedése ( $88,07 \pm 0,25$ ,  $121,0 \pm 0,25$  ng hormon/ mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.,  $p < 0,001$ ) volt megfigyelhető. Az 1,0 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés során a PRLOMA modellben a PRL hormon szekréció emelkedését detektáltuk, ami döntően a kontroll karakterisztika alatt maradt.



**27. ábra** Extracelluláris  $[K^+]$  koncentrációk változásának hatása a PRL release-re PRLOMA modellben.

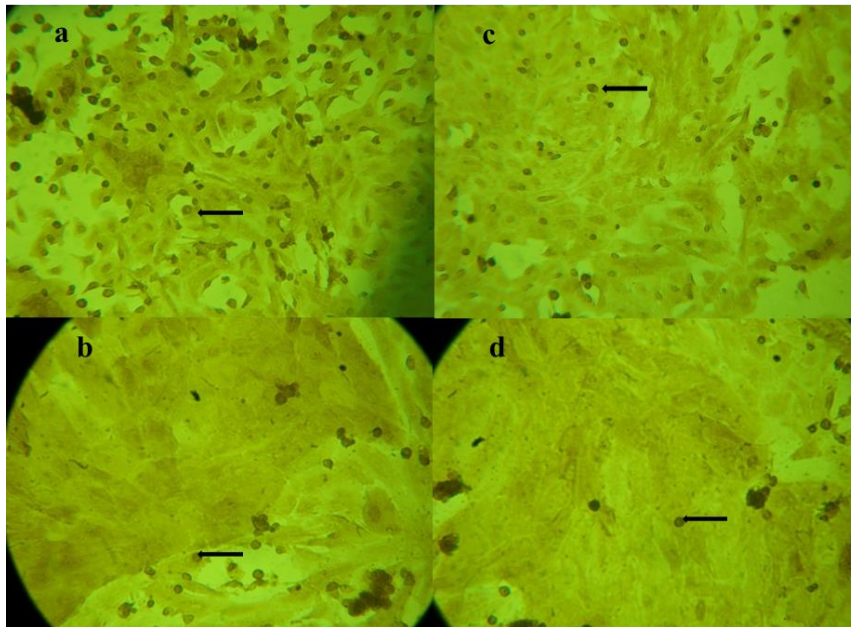
(Átlag $\pm$ S.E.M., kontroll: fiziológias Tyrode oldatban; sejtkultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM  $[K^+]$  (K0\*); 0,5 mM  $[K^+]$  (K0,5\*); 1,0 mM  $[K^+]$  (K1,0\*); 1,5 mM  $[K^+]$  (K1,5\*); 2,0 mM  $[K^+]$  (K2,0\*), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ )

Az 1,5 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés során a PRLOMA sejtkultúrák hormon elválasztása a 10. percben emelkedett ( $9,63 \pm 0,02$  ng PRL / mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ), de a továbbiakban szignifikánsan csökkent ( $6,28 \pm 0,04$ ;  $5,32 \pm 0,03$ ;  $15,77 \pm 0,02$ ;  $23,24 \pm 0,07$  ng PRL/ mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A 2,0 mM-os extracelluláris  $[K^+]$  kezelés hatására a PRL szekréció csökkent ( $2,7 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) kísérlet 10. percében. A 20. percben a PRL szint diszkrét emelkedése ( $7,61 \pm 0,04$  ng hormon/ mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.,  $p < 0,001$ ) történt a kontroll relációjában. A kísérleti protokoll további mintavételi időpontjaiban a PRL szint szignifikánsan csökkent ( $10,94 \pm 0,03$ ;  $17,93 \pm 0,03$ ;  $19,29 \pm 0,03$  ng hormon/ mg protein, átlag $\pm$ S.E.M.,  $p < 0,001$ ).

A hipokalémiás kezelések háttérmechanizmusainak feltárásához immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A B-sejt limfoma protein-2 (*Bcl-2*) vitalitási fehérje PAP/DAB festéssel való követését mutatja az alábbi ábra (28. ábra). Az immunhisztokémiai kép **a** és **b**: kontroll szegmense a primér AdH sejtkultúrák *Bcl-2*

aktivitását mutatja. A **c** és **d**: primér, AdH monolayer sejtkultúrák hipokalémiával terhelt eredményeit mutatják a csökkent Bcl-2 aktivitást igazolva. Az ábrákon nyíllal jelezve egy-egy Bcl-2 expressziós hely (a-d OM: 40x).



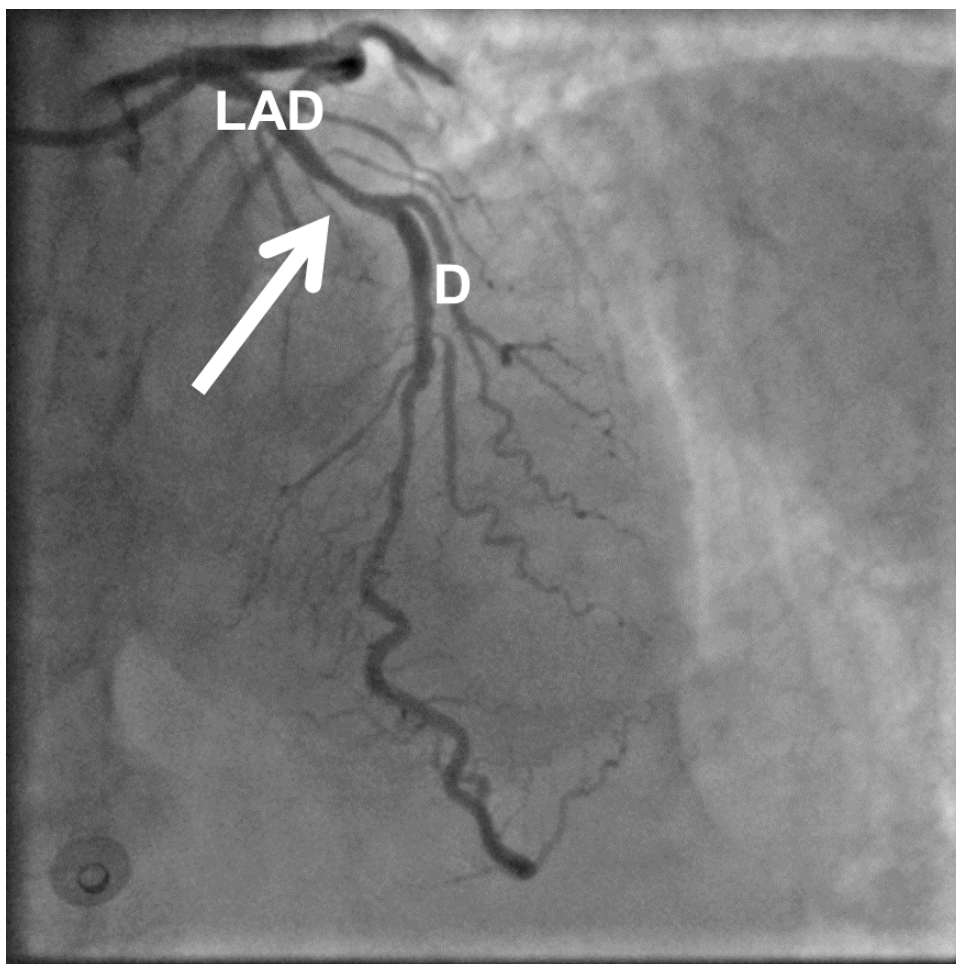
**28. ábra** *Bcl-2 antiapoptotikus protein immunocitokémiai vizsgálata ♂ Wistar patkány AdH-ban*

(A sejteket antiszérium specifikus Bcl-2-vel festettük, az antitesteket PAP/DAB festési módszerrel tettük láthatóvá. a, b: kontroll AdH, c, d: AdH hipokalémia hatására bekövetkező Bcl-2 expressziós változása, nyíllal jelöltük a Bcl-2 expressziós helyeket. (a-d: 40x))

Az experimentális vizsgálatok során tapasztaltakat a klinikai gyakorlatban hasznosítva, a vazospasztikus anginát mint „kiszavar”-t és az aneurizmát mint fixálódott „strukturális zavar”-t vizsgáltam. Mivel esettanulmányokban kerültek a nevezett eltérések bemutatásra, ezért ezek eredményeinek interpretálásához meg kívánom említeni, hogy a vizsgált betegek akut infarktus klinikai képével kerültek ellátásra. A vaszkuláris eltérések detektálásához invazív és non-invazív képalkotó beavatkozásokat végeztem, melyek eredményeit az alábbiakban mutatom be.

### 1. Ok-okozati rendszerű vazospazmus vizsgálat

A szív-tájéki komoly panaszokkal jelentkező betegnél koszorúér angiográfiás vizsgálatot végeztem. Anamnézisében említett volt a dohányzás.

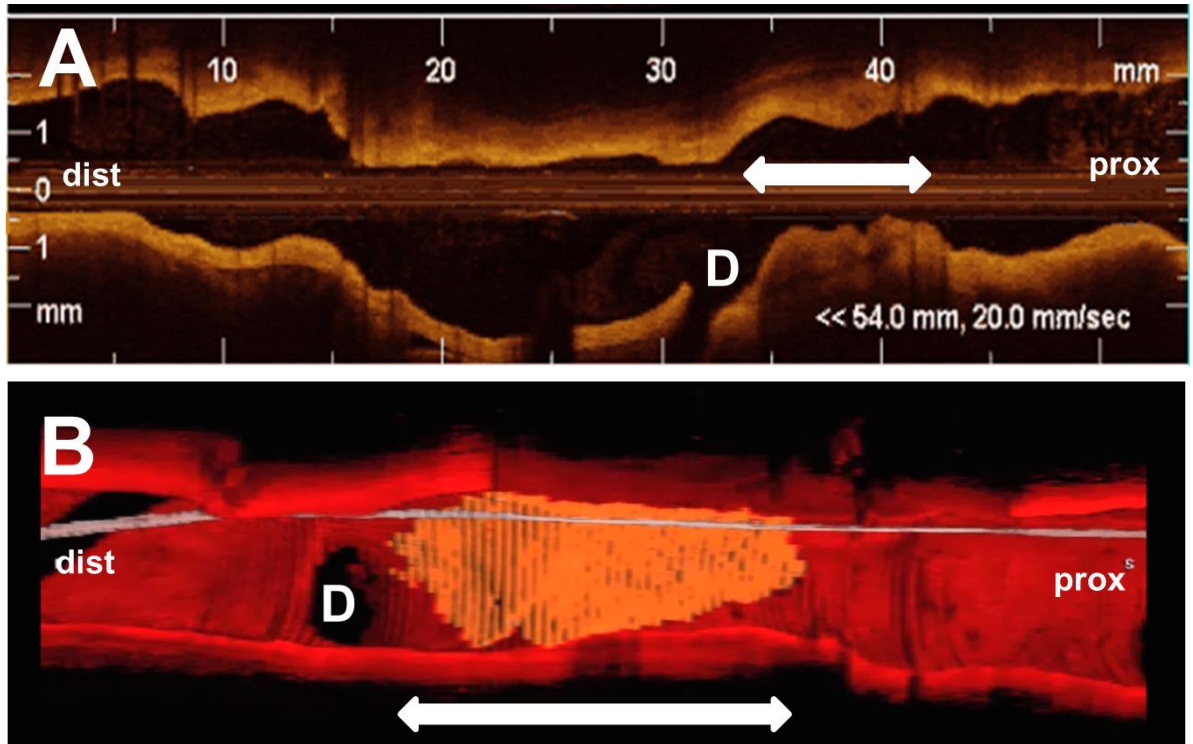


**29. ábra** Bal koszorúér angiográfiás vizsgálata

(LAD: ramus descendens anterior, D: diagonális ág, fehér nyíl: szűkület ábrázolódik )

A 29. ábrán látható, hogy a ramus descendens anterior (LAD) proximális szakaszán közel 50%-os szűkület ábrázolódik (fehér nyíl) közvetlenül a diagonális ág (D) eredése felett. Az áramlási tényezők zavarának további tisztázása okán második beavatkozásban OCT vizsgálatot is végeztem (30. ábra), mivel a beteg romló állapotát az elvégzett koszorúér angiográfiás vizsgálat eredményei nem magyarázták.

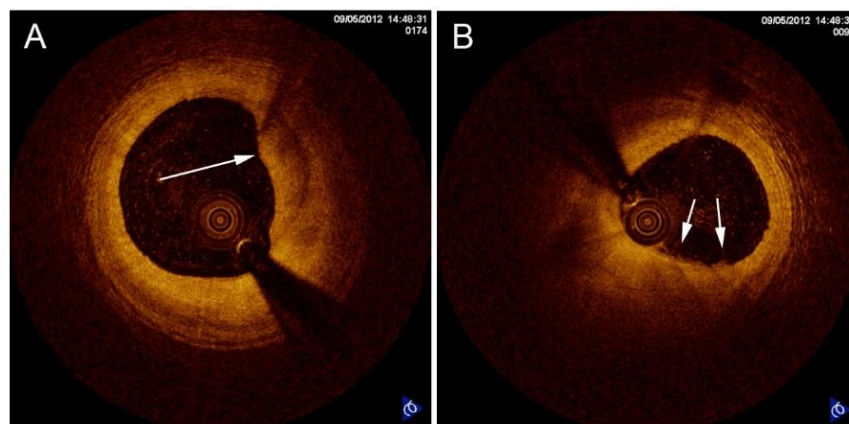




**30. ábra** *A ramus descendens anterior OCT vizsgálati eredménye*

(A képi elemek „A” (felső kép): 2D (regisztrátum L:54.0mm, v:20.0mm/s, prox: proximális, dist: disztális) és az alsó kép „B”: 3D rekonstrukciós hosszsz metszeti megjelenítésében láthatók (diagonális ág (D), prox: proximális, dist: disztális)

A 30. ábra „A” részletében két dimenziós (2D) hosszsz metszeti felvételt jelenítettem meg. Látható, hogy a ramus descendens anterior (RDA) 35-42 mm-es szakaszán a diagonális ág (D) eredésétől proximálisan trombus ábrázolódik. Az alsó képszakaszon egy rekonstrukciós 3 dimenziós felvételen jól megfigyelhető a diagonális ág eredésétől proximálisan elhelyezkedő (szervült) trombus képe.



**31. ábra** *A ramus descendens anterior OCT felvétele*

(„A”: az 50%-os szűkület koordinátáinál; „B”: a trombustól disztálisan, detektált keresztmetszeti kép)

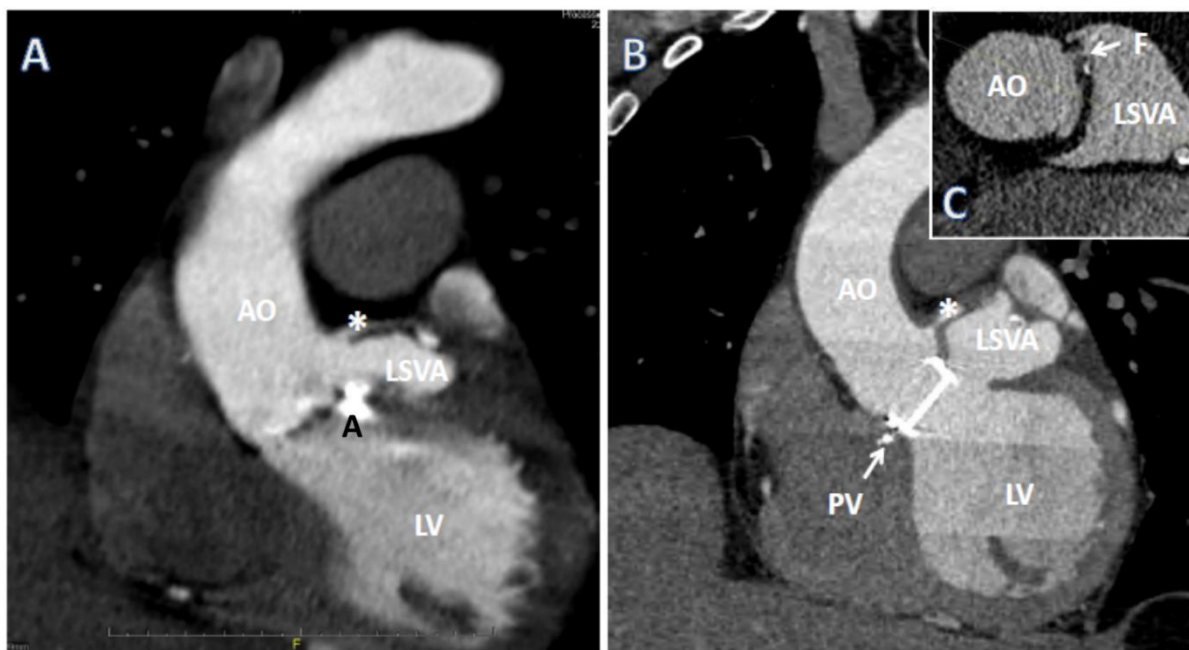


A 31. ábra „A” jelzésű képrészletében, a RDA proximális szakaszán az 50%-os szűkületnek megfelelően ellapult fali trombus figyelhető meg (fehér nyíllal jelölve). Az ábra „B” képi részletében a RDA-ban detektált trombustól disztálisan intima laceráció jelei is ábrázolódnak (fehér nyilakkal jelezve).

## 2. A strukturális zavarként értelmezhető aneurizma klinikai vizsgálata

A klinikán életveszélyes állapotban jelentkező beteg vizsgálatát és kórfolyamatának feltárását egy másik esettanulmány alapján mutatom be.

Az 32. ábra “A” képrészletében, a preoperatív felvételen (ferde koronális sík) látható, a bal Valsalva tasakból kiinduló 30x30 mm nagyságú nem ruptúrált bal szinusz Valsalva aneurizma (LSVA). Ennek a bemenete a bal koszorúér szájadéka (\*) valamint a kalcifikált aorta billentyű anulusza (A) között ábrázolódik.



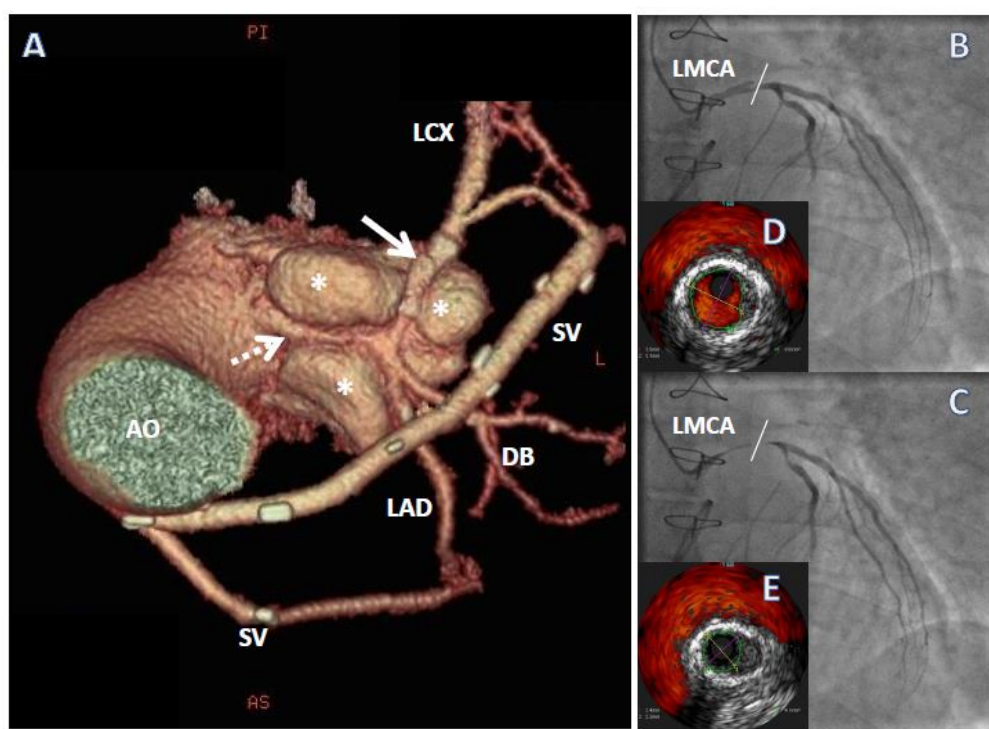
**32. ábra** Multi-detektoros szív CT felvételek az aneurizma strukturális vizsgálatában

(AO: aorta gyök, LSVA: bal szinusz Valsalva aneurizma, LV: bal kamra, (\*): bal koszorúér törzs, PV: műbillentyű, F: fistula, A: aorta billentyű anulusz; \*: a bal koszorúér szájadéka)

Az 32. ábra “B” képrészletében a műbillentyű implantációt követően, négy hónap múlva készített posztoperatív felvételen (ferde koronális sík) a bal szinusz Valsalva LSVA) növekedése (40x40 mm) jól kirajzolódik. A műbillentyű (PV) síkja alatt a bal kamra (LV) üregével közlekedik. (“Ventrrikularizált szinusz Valsalva aneurizma”). Az ábra “C”

részletében, a posztoperatív axiális felvételen a műbillentyű feletti síkban az aorta gyök (AO) és aneurizma (LSVA) között kis fisztula (F) is ábrázolódik.

Az 33. ábra “A” képrészletében műbillentyű implantáció után 4 hónappal készített multi-detektoros szív CT angiográfiás felvétel volumen-renderelt 3D rekonstrukciója látható. Megfigyelhető, hogy a bal szinusz Valsalva aneurizma (\*) kesztyűujjszerűen körbeveszi a bal koszorúér fő törzsét és komprimálja azt (szaggatott nyíl). Kirajzolódnak a ramus descendens anteriorhoz (LAD) és ramus circumflexushoz (LCX) futó véna saphena graftok (SV), valamint a ramus circumflexusba (LCX) korábban implantált sztent (fehér nyíl).

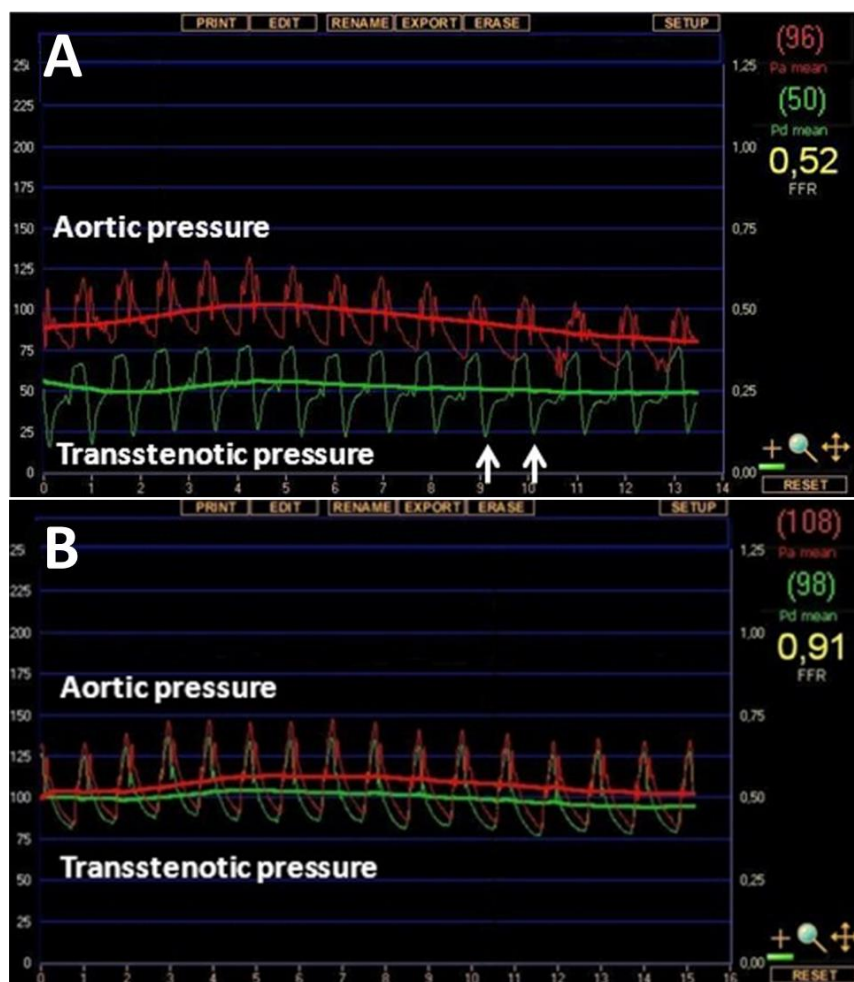


**33 ábra** A bal koszorúér fő törzs külső kompressziójának multi-modális morfológiai vizsgálata

(AO: aorta gyök, LCX: ramus circumflexus, LAD: ramus descendens anterior, SV: véna saphena graft, DB: diagonális ág, (\*): bal szinusz Valsalva aneurizma, fehér nyíl: stent, szaggatott nyíl és LMCA: bal koszorúér fő törzs)

Szelektív bal koronária angiográfia diasztolében, (a 33. ábra “B” részletében) és szisztolében (a 33. ábra “C” részletében) igazolt a bal koszorúér fő törzsének (LMCA) dinamikus kompressziója. Jól észlelhető, hogy diasztolében kimutatható, de már szisztolében nem detektálható az érben véráramlás. A bal koszorúér fő törzsének intravaszkuláris ultrahang (Chroma Flow) vizsgálata diasztolében (a 33. ábra „D” képeleme) és szisztolében (a 33. ábra „E” képrésze) bizonyította a bal koszorúér közös törzsének (LMCA) dinamikus kompresszióját. Jól megfigyelhető, hogy diasztolében

(„D” képrészben) az érben és az azt körülvevő aneurizmában egyaránt detektálható áramlás (vörös szín), míg szisztolében („E” képrészben) csak az aneurizmában észlelhető áramlás (vörös szín).

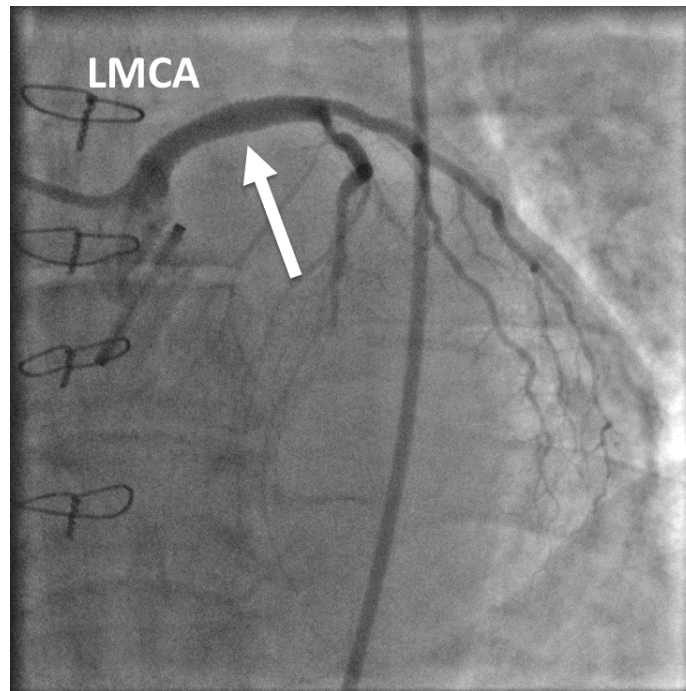


**34. ábra** A bal koszorúér (fő törzs) külső kompressziójának funkcionális (frakcionális flow rezerv) vizsgálata a kezelés (A) előtt és a kezelés után (B)

(Transz-sztenotikus nyomás: zöld regisztrátum, aortában mért nyomás: piros regisztrátum; FFR: frakcionális flow rezerv.)

Az 34. ábra „A” képrészletében, a bal koszorúér közös törzsének sztent implantációja előtt 180 µg/kg/min adenozin iv. infúziójával elért maximális hiperémiában a diagonális ágban mért transz-sztenotikus nyomás (zöld regisztrátum) átlagos értéke: 50 Hgmm. Az aortában mért nyomás (piros regisztrátum) átlagos értéke: 96 Hgmm, mely alapján a kapott FFR értéke: 0,52; a transz-sztenotikus nyomásgörbén tehát, szisztolés nyomásesés figyelhető meg (fehér nyilak). A 34. ábra „B” részletében, a bal koszorúér közös törzsének sztent implantációját követően 180 µg/kg/min adenozin iv. infúziójával elért maximális hiperémiában a diagonális ágban mért transz-sztenotikus nyomás 98 Hgmm,

aortában mért nyomás: 108 Hgmm, amely alapján a kapott FFR érték: 0.91, a transz-sztenotikus görbe normalizálódása figyelhető meg.



**35. ábra** *Szelektív bal koszorúér angiográfia a bal koszorúér főtrzs kezelését követően  
(LMCA: bal koszorúér főtrzs, fehér nyíl: megszüntetett kompresszió)*

Az 35. ábra szerint, az LMCA dinamikus külső kompressziójának beavatkozást követő megszűnése látható (fehér nyíl).

## 9 Megbeszélés, következtetések

Doktori disszertációm megbeszélés, következtetések fejezeteit a célkitűzésben bemutatott igénypontoknak megfelelően tagolom.

Jelen munkám során kutatási feladatomnak tekintettem a környezettoxikológiai szempontból jelentős hatótényezők közül az aromás szénhidrogének és halogénezett származékaik biológiai szerveződési komplexitásokban (celluláris, organizmus szint) zajló vizsgálatát. Ebben az összefüggésben a hangsúlyt a homeosztatikus diszruptor tulajdonságokon belül, az endokrin diszruptor (ED) hatások feltárására helyeztem, amit az indokolt, hogy kutatóműhelyünk, elsősorban ezekre a célterületekre fókuszált állatkísérletes vizsgálataiban. Orvosként kiemelt célként jelöltem meg, hogy az experimentális kutatásainkba bevont hatótényezők ED hatásait olyan szempontoknak megfelelően kutassam, amelyek segítségével kapcsolatot tárhatok fel humán patológiás folyamatokkal. Ezen belül is a vazokonstrikcióval és az aneurizma kialakulással járó szívérrendszer megbetegedésekre kívántam fókuszálni, amikor az orvosi gyakorlat (diagnosztika, preventív medicina, terápiatervezések) számára is jelentős környezettoxikológiai experimentális kutatásokba bekapcsolódtam. Az ED hatások háttérmechanizmusainak (vazospazmussal vagy aneurizma kialakulásával járó) kardiovaszkuláris betegségekben betöltött lehetséges szerepét a biológiai hálózati kapcsolatok alapján kívántam feltárni és közös csomópontokként megjeleníteni.

A munka során először a vázolt hatótényezők hatáseredményeinek tanulmányozásához kellett standardizált expozíciós útvonalat kialakítani. A szakirodalom szerint a halogénezett szénhidrogének közül az általunk is vizsgált ClB-ok az ökológiai rendszerekben a táplálékláncon keresztül deponálódnak [15]. Ez a magyarázata annak, hogy az emberi expozícióknál is jelentős a táplálékkal történő terhelés. Noha ezek az ágensek bőrön és aspirációs úton is bejuthatnak az organizmusokba [24,25,26], így az emberbe is, de az emberi expozíciót mégis döntően a táplálkozási útvonal dominálja, ezért érdemes ezt szimulálni a kísérleti tervezés során. A kutatásokhoz, az orvosi gyakorlatban használatos csecsemő *gyomorszondát* alkalmaztuk, ezzel juttattuk be a hatótényezőket, ami *biztonságos dozírozást és kontrollrendszerek* megjelenítését tette lehetővé. A kutatásokhoz leletezett Wistar patkányokat használtunk. Ezek a laboratóriumi állatok 30-36 hónap élettartamúak [73], ezért, ha krónikus vizsgálatokat akarunk végezni patkánymodellel, akkor ennek megfelelően kell az optimális kezelési periódusokat beállítani. *Előkísérletekben* került meghatározásra a 100-120 g-os modellállatok 0-90

*napos kezelési protokollja.* Mivel regeneratív vizsgálatokat is el kívántunk végezni, ezért is volt *megfelelő az említett kezelési periódus.* Ugyanakkor, ha a kezelési protokoll és a modellállat élettartamának relációját tekintjük, akkor az expozíciós időszáv az élettartam 1/12- 1/10 részét fedte le. Amennyiben ezt humán esetre extrapoláljuk, akkor ez egy átlagosan 75 éves élettartam esetén 6,2-7,5 év időtartamú expozíciós terhelésnek feleltethető meg. A szakirodalom szerint a lengyel lakosoknak csak a HCIB-re vonatkozó napi terhelése 1,4 µg/fő/nap [187]. Ennek ismeretében és a humán extrapolációs lehetőség érdekében kerestük meg patkány esetén azt a napi dózist, amely még szubtoxikus és az előkísérletek alapján a kezelési időszávban sem okoz a modellállatoknál toxikus hatásokat. A kísérletekben, a fenti megfontolásokkal harmonizált expozíciók dózisainak szubtoxikusságát a toxicitást jelző májenzimek alakulásával prezentáltam (3. és 4. táblázat). A feltüntetett májenzimek a kezelés időtartama alatt nem mutattak a normál tartománytól eltérő értékeket. Továbbá a modellállatok kezelési időszávban való leletezésekor sem tapasztaltunk toxicitásra utaló jeleket. *Ezért jól reprodukálható módon, az in vivo klórbenzol kezeléseket 0,1; 1,0; 10,0 µg/ttg kg/nap dózisokra és 30, 60, 90 napos időszávokra állítottuk be.* A kezelési séma viszonyítási rendszerének kialakításában abszolút -, stressz -, negatív - és pozitív kontrollokat alkalmaztunk (módszerek 7.1.1.). A kutatási protokollokban az alkalmazott expozítorok ED hatásait kívántuk vizsgálni. Ezek *az expozíciós hatások viszont nemcsak az egészséges organizmusokat érinthetik, hanem a patológias folyamatokkal élőket is,* ezért további kutatási modellt alakítottunk ki.

*Ösztrogén receptor (ER) mediálta endokrin zavart* váltottunk ki szubkután, hat hónapon át beültetett (150 µg/ttg kg/hét) ösztroin-acetáttal. Az ösztroin-acetát kezelés *prolaktinomás adenohipofízis megjelenését eredményezte.*

A kialakított patkány betegségmodellnél jelentős tényezők voltak egyrészt a CIB-ok ismert ösztrogénmimetikus hatásai [193], másrészt a PRL és az ösztrogén kardiovaszkuláris kapcsolata [229]. Ugyanakkor, ha a prolaktinomás adenohipofízises modellállatoknál és az *in vitro* PRL-OMA modelleknél (módszerek 7.1.1.3 és 7.2) a közvetlen és/vagy közvetett ED hatások is igazolhatók [39,195], akkor azok a klinikai relációi is jelentősek. Továbbá biztonsággal jellemezhető sejtszinten is a kórfolyamat az emelkedett spontán PRL elválasztással (eredmények: 1. és 2. táblázata). A modell reprodukálható és standardizálható, egyrészt az elválasztott PRL tartalommal, másrészt immunhisztokémiai szövettani vizsgálatokkal, ahol az IR PRL tartalomra festődő sejtek relatív gyakorisága alapján történt a kísérleti csoportok kialakítása.

A 2. célkitűzési pontban megfogalmazottak szerint a CIB és fenilurea vegyületek ED hatásait kutattam. Kerestem a választ azokra a kérdésekre, hogy az esszenciális endokrin folyamatokban (a HMT működésében és az AVP elválasztásban) okozhatnak-e változást az aromás és/vagy halogénezett szénhidrogén expozitorok (dCIB, mCIB, PU, MU, DU)? Orvosi szempontból fontos kérdésként kezeltem még, hogy a celluláris (hormon release) és organizmus (plazma hormontartalom) szinten megjelenő hatáseredmények mennyire függenek össze? Továbbá a kialakított PRLOMA („betegség”) modellben az expozitorok kiváltotta hatások eltérőek-e a normál adenohipofízis működéstől?

A fenti kérdéskörök megválaszolásához kísérleti modelleket kellett létrehozni, egyrészt a HMT működés szimulálására *in vitro* AdH és PRLOMA vonatkozásában. Az *in vitro* (módszerek 7.2), standardizált AdH és PRLOMA modellek ACTH elválasztást szabályozó ciklusa (eredmények 10. és 11. ábrák) B és AVP alkalmazásával került beállításra. A mellékvese B hormonja gátolja az AVP koaktivált ACTH elválasztást [195]. Ezt az *in vivo* regulációs mechanizmust szimuláltuk a sejt kultúrákban, meghatározva előzetes kinetikai vizsgálatokkal az optimális kísérleti körülményeket. Látható a 10. ábrán, hogy a kortikoszteron képes kivédeni az AVP ACTH release-aktiváló hatását, amennyiben az AVP adást megelőzően már jelen van a kísérleti médiumban. Ez a szabályozás a PRLOMA esetén is hasonlóan jelen van (11. ábra). Viszont a PRLOMA kultúrák ACTH elválasztása szignifikánsan magasabb az AVP aktivált esetben az AdH azonos eredményeihez viszonyítva. *Mindez azt sugallja, hogy PRLOMA esetén nemcsak a PRL elválasztás mértékében (2. táblázat), hanem az endokrin reguláció esszenciális szabályozási folyamatában is zavar generálódott. Az AdH és PRLOMA modellek sejtszinten igazolták a regulációs válaszok közötti különbségeket az egészséges és beteg patkánycsoportok között.* Fontos megjegyezni, hogy mind az AdH, mind a PRLOMA esetén működik a HMT szabályozás, de annak hormon mediált szintjeiben már szignifikáns eltérések jelentek meg. *Klinikusként ezt fontos megállapításnak vélem, miszerint az egészséges és „beteg” sejtek eltérő regulációs hangsúllyal szólnak bele a homeosztatikus szabályozásba.*

Amikor *in vivo* hatótényezőként vannak jelen a CIB-ok (12. ábra), azaz organizmus szintű az expozíció, akkor a sejtszintű válaszban, az ACTH szignifikánsan emelkedő elválasztása dózis- és időfüggően zajlik. Az eltérő időtartamú és dózisu CIB kezelésekre (16. ábra) adott *organizmus szintű válasz esetén, a plazma ACTH*



*tartalmakban is szignifikáns változást találtunk, amely a celluláris szinten megjelenő hatásválaszokkal jól korrelált.*

*In vitro* expozícióban (13. ábra) *celluláris szinten*, a mCIB szignifikánsan emelte a HMt modell-működésben az AVP aktivált ACTH release-t. Hasonló hatást mutatott a dCIB is. Tehát, *a kísérleti eredmények szerint a CIB kezelésekre adott ACTH release válaszok sejt és organizmus szinten is koherens összefüggést mutattak.* Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy *a megemelkedett ACTH elválasztás* további egészségestől eltérő folyamatokat generálhat, amennyiben a *kardiovaszkuláris érintettségére* koncentrálnak. Noha az ACTH szerepe ebben a vonatkozásban még nem tisztázott, ugyanakkor igazolt a szívben az MC<sub>3</sub> receptorok jelenléte [135,230], amelyek hasonló affinitással kötik az ACTH-t, mint a melanokortint. Patkány-modelleken végzett kísérletek szerint az MC<sub>3</sub> és MC<sub>4</sub> receptor agonisták jelenléte szívfrekvenciafokozó és vérnyomás emelő hatású [137]. *A citált adatok azt sugallják, hogy a CIB ágensek ACTH regulációt zavaró hatása a kardiovaszkuláris folyamatokkal kapcsolatba hozható.*

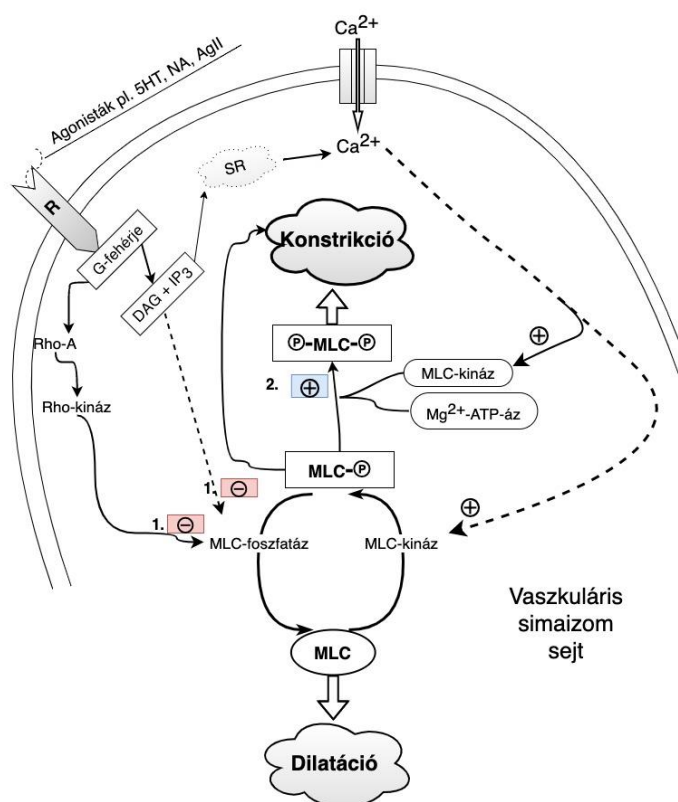
Az uron vegyületek (PU, MU, DU) celluláris szinten, halogénezettségi homológ soruk szerint szignifikáns mértékben fokozták az AVP aktivált ACTH elválasztást (14. ábra). Az AdH modell alap PRL elválasztásában (15/a. ábra) nem tapasztaltunk értékelhető eltéréseket a dCIB, CIB keverék, PU, MU, DU esetében a kontroll relációjában.

PRLOMA modellben (14. ábra) a dCIB és a CIB keverék szignifikánsan megváltoztatta a HMt modell működését a szekretált ACTH volumene tekintetében. Hasonlóan a CIB-ok kiváltotta hatáshoz, az uronok jelenlétében is fokozódott az ACTH release (14. ábra) a HMt szimulált működésben. *Összevetve a PRLOMA és AdH celluláris működését a HMt vonatkozásában, látható, hogy a PRLOMA fokozta az elválasztott ACTH koncentrációkat az aktivált és gátolt regulációban.* Ez a sejtválasz természetesen organizmus szintű megerősítés után (*in vivo* proaktinomás patkányok halogénezett szénhidrogén kezelése), további kutatási utat nyit meg a prolaktinomás betegségek és az ACTH közvetítette esetleges centrális és perifériás - itt elsősorban a vazotónus folyamatokra koncentráló - zavarok kutatásában.

Az *in vitro* PRLOMA modell PRL release (15/b. ábra) többszörösére emelkedett az AdH-hoz viszonyítottan. A (15/a. ábra) a celluláris PRL bazális elválasztás és a dCIB és mCIB jelenlétében mért ACTH release szignifikánsan emelkedett. *A fenilurea ágensek itt is a halogénezettség homológ sorának függvényében fokozták a PRL alap elválasztást.* A PRL nem esszenciális hormon, ennek ellenére számos mechanizmusban nagyon fontos

szerepet játszik, pl. a kardiovaszkuláris rendszer működésében is. Ismert a PRL az N-terminális fragmentjének koszorúér relaxáció gátlása simaizomsejteken [139], a NOS és  $\beta_2$ -adrenerg gátlással kiváltott vazokonstriktós hatása [140], valamint endotél-dependens vazotónust reguláló hatása [141]. Ezek alátámasztják azt a tényt, hogy a vazokonstriktókban az érszűkítő hatás megjelenésében kiemelt figyelmet érdemel a PRL. Ugyanakkor szem előtt kell tartanunk azt is, hogy az általunk vizsgált halogénezett szénhidrogénnel és a fenuronokkal nemcsak, mint ED vegyületekkel, hanem, mint kardiovaszkuláris zavarokat a PRL-on keresztül is potenciálisan generálni képes hatóanyagokkal kell számolnunk. Mindezt indokoltá teszi továbbá az is, hogy a PRL a NOS regulációban való érintettségével közvetlenül képes beleszólni a vazokonstriktós folyamatokba.

A vazokonstriktókban különleges szerepet kap a foszforilált állapotú miozinkönnyűlánc, amely ATP és  $Mg^{2+}$  jelenlétében  $Mg^{2+}$ -függő ATP-áz funkciót is mutat (36. ábra).



**36. ábra** A vazotónus szabályozásában jelentős  $Mg^{2+}$  ATP-áz, RhoA/Rho kináz útvonal és monoamin agonisták szerepe a vazokonstriktó kialakulásában

A vaszkuláris simaizomtónus esszenciális regulátora a MLC melynek foszforilációja kontrakcióhoz, defoszforilációja relaxációhoz vezet. Az MLC foszforilációját az MLC-kináz katalizálja  $Ca^{2+}$ /kalmodulin komplex jelenlétében. A monoaminok 7 transzmembrán proteinnel rendelkező G-fehérjéhez kapcsolt receptoraktivációval  $IP_3$ /DAG szignalizációs útvonalon az intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktárokon (SR) valamint a

$\text{Ca}^{2+}$  influxon át fokozzák az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt, mely az MLC  $\text{Ca}^{2+}$ -függő foszforilációjához és simaizom kontrakcióhoz vezet. Az MLC defoszforilációját a MLC-foszfátáz végzi, melyet a monoaminok receptoraktivációja a RhoA/Rho-kináz útvonalon keresztül valamint a DAG révén gátol. Ennek következtében a monofoszforilált MLC felhalmozódik és szubsztrátként viselkedik újabb foszforilációs mechanizmusokban. Az így keletkezett difoszforilált MLC  $\text{Mg}^{2+}$  és ATP jelenlétében  $\text{Mg}^{2+}$ -függő ATP-áz funkcióval is rendelkezik, mely a miozin és az aktin filamentumok gyorsabb és hatékonyabb összekapcsolódását teszi lehetővé, hozzájárulva a simaizom hiperkontrakcióhoz és következményes vazokonstriktióhoz. **MLC** - miozin könnyűlánc, **MLC-kináz** – miozin könnyűlánc kináz, **MLC-foszfátáz** – miozin könnyűlánc foszfátáz, **R** – 7 transzmembrán proteinnel rendelkező G fehérjéhez kapcsolt monoamin receptor, **5HT** – szerotonin, **NA** – noradrenalin, **IP<sub>3</sub>** - inozitol-3-foszfát, **DAG** – diacil-glicerol, **SR** – szarkoplazmás retikulum, **AGII**: angiotenzinogén II,

A kutatások során ez adta a motivációt arra, hogy megvizsgáljam a CIB-ok  $\text{Mg}^{2+}$ -dependens ATP-áz funkciókra kifejtett hatását. Az *in vivo* CIB kezelt AdH sejtkultúrák nonmitokondriális frakcióinak  $\text{Mg}^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitását (17. ábra) dózis- és időfüggő módon szignifikánsan fokozták a kezelések. *Mindez erősen felhívja a figyelmet arra, hogy a hormon mediációt közvetlenül zavaró, ED hatású CIB-ok, a vazospazmusban is komoly jelentőségűek lehetnek, mert a  $\text{Mg}^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitást szignifikánsan fokozni képesek.*

A 2. célkitűzési pontban megjelölt neurohipofízishez kötött esszenciális hormonregulációt (AVP) - is hipofízis szinten - kívántuk tanulmányozni, a hatótényezők (CIB ágensek) jelenlétében (módszerek 7.2.5 és 7.2.4). Majd a nem esszenciális hormonnak tekintett OT elválasztásra gyakorolt hatásokat követtük. Hasonlóan az adenohipofízis vizsgálatoknál bemutatott kutatási logikához, ebben a vonatkozásban is a celluláris és organizmus szintű események feltárása mellett, nagy hangsúlyt fektettem azok relációinak vizsgálatára. Mindez a már sokszor utalt klinikai gyakorlathoz való iterálás szempontjai szerint elengedhetetlen. Ezért kerültek tanulmányozásra a neurohipofízis sejtszintű excitotikus (AVP, OT) aktivitási válaszai az *in vivo* CIB kezelések hatására. Ezen vizsgálataimmal is az orvosi gyakorlattal való kapcsolatot kerestem, amit az AVP ereken kifejtett vazokonstriktor hatása indokolt [96]. Az OT viszont lehetséges kardioprotektív [131] hatású, amit a NO szintézis fokozó hatásával értelmezhetünk [97]. Így e két hormont zavaró diszruptor hatások keresése dolgozatom stratégiai célja szempontjából is igen megalapozottnak mutatkozott. Az 18. és 19. ábrákon került feltüntetésre az *in vivo* CIB krónikus kezelések hatása az AVP és OT elválasztásokra. A CIB hatótényezők ED hatásúaknak bizonyultak, mert az alkalmazott dózisokban a 90. napon szignifikánsan fokozták az AVP elválasztást. Az 18. ábra elemzése feltárja azt is, hogy a CIB-ok valóban deponálódó tulajdonságúak, ugyanis az alacsonyabb dózisu kezelésüknél a kísérlet 60. napjáig a kontroll értékhez közeli maradt az AVP elválasztás, ami csak a 90. naptól fokozódott. A nagyobb dózis esetén a 30.

napnál kiváltott AVP szint csökkenés a kezelések során egyre emelkedő AVP elválasztásokat mutatott.

A kísérleti protokollban a monoamin receptorokhoz kapcsolt AVP elválasztást fokozó *in vitro* szabályozási mechanizmus modellben (módszerek 7.2.5) vizsgáltuk a ClB ágensek további hatásait. Mivel kardiovaszkuláris szempontból mind a NA, mind az 5-HT nagy jelentőségű, így kutatásainkban ezen monoamin regulációkra fókuszáltunk. A NA vazospazmusbeli hatásait megalapozóan ismert az erek endotélsejteinek  $\alpha$ -2,  $\beta$ <sub>1</sub>,  $\beta$ <sub>2</sub> és  $\beta$ <sub>3</sub> adrenerg receptor stimulációja, mely a NO szintézis révén csökkenti az erek  $\alpha$ -1R stimulusra kimutatható vazokonstriktációját [86,87]. Az 5-HT intravazális trombusokból felszabadulva [78] direkt endotél vagy közvetett vaszkuláris simaizomsejt hatásokkal mediál vazokonstriktív mechanizmusokat. Ezek az összefüggések alátámasztották kutatómunkánk kiterjesztését az AVP monoamin aktivált szabályozásának vizsgálatára a ClB hatótényezők jelenlétében. A 18. ábra jól szemlélteti, hogy a NA által regulált AVP elválasztását a D2 dózis minden kezelési időszámban szignifikánsan megváltoztatta. Az 5-HT szignifikáns AVP fokozó hatása csak a 60. naptól volt detektálható mindkét dózisban. Az ábra igazolja azt a *feltevésemet miszerint a hatótényező/hatás vizsgálatok során nem elég egy fiziológiai szempontból jelentős bioaktív anyagtartalom követése, hanem annak szabályozásokban történő vizsgálata is elengedhetetlen*. Az orvosi gyakorlatban alkalmazott gyógyszeres (dobutamin, dipiridamol, adenozin) terheléses vizsgálatok is ezt a tényt támasztják alá.

Az *in vivo* ClB kezelések hatására az OT elválasztás változásait (19. ábra) D2 dózis esetén azonnal, a D1 dózis esetén késleltetve tapasztaltuk. Mindez azt mutatja, hogy a deponálódással átlépett hatásküszöbszint elérése után jelent meg a kiváltott válasz, nevezetesen az emelkedett OT release. Tehát, ED hatást igazoltak ClB vizsgálataink az OT release tekintetében is. Az OT elválasztást monoamin regulációban vizsgáló protokollban, a NA hatásnál a 90. napon mindkét dózissal szignifikáns emelkedést észleltünk, de a D2 dózissal már a 60. napon megjelent ez a kontrollhoz viszonyítva. A 5-HT-nal kiváltott OT release regulációban mindkét dózis esetén a 60. naptól szignifikánsan fokozódott az OT release a kontroll relációjában.

*A pituitariták ClB kezelésekre bemutatott celluláris szintű válaszai (18. és 19. ábra) megalapozzák annak kimondását, hogy nemcsak ED, hanem nED hatásokat sikerült feltárnunk kutatásaink során.*

*Az organizmus szintű vizsgálatok eredményei (20. ábra) (D1 és D2 dózissal) ClB in vivo kezelésekre hatására a vérplazma AVP és OT tartalmának olyan változásait mutatták,*

amelyek nagy összhangban vannak a celluláris szintű AVP és OT release funkciók eredményeivel. Az AVP vérplazmaszintek a 90. napos kezelési időpontban szignifikánsan emelkedtek mindkét kezelési dózis esetén a kontroll relációjában. Az OT viszont D1 dózisban is már szignifikánsan fokozódott a kezelési időtartamokkal arányosan a kontroll viszonylatában. Ugyan a CIB kezelések D2 dózisára is igaz ez az állítás, de a 30. napos kezelési periódusban először csökkent, majd ezután szignifikánsan és egyre emelkedett a vérplazma OT tartalma a kontrollhoz viszonyítva.

További organizmus szinten megjelenő CIB kezelési hatáseredményeket jelentettek kutatásainkban a viselkedési elemek tanulmányozásai. Mivel az AVP és OT [231], valamint a NA [232] és 5-HT [233] is jelentős szerepet játszik a pszichoaktivitásban és a viselkedési mintázatok alakulásában, így a CIB hatásokat ebben az összefüggésben is vizsgáltuk (módszerek 7.1.1.2). Az *in vivo* D1 és D2 dózisú, 30, 60, 90 napon keresztül kezelt modellállatok OF (módszerek 7.1.1.2.1), EPM (módszerek 7.1.1.2.2) és RI (módszerek 7.1.1.2.3) viselkedési vizsgálatokkal követhető szorongás, exploratív és offenzív viselkedéseit kutattuk.

Eredményeink szerint (21/A. ábra) a CIB-ok OF tesztben a szorongást szignifikánsan fokozó hatásúak. Mindezt alátámasztja az, az irodalomból ismert adat is, miszerint szorongásban a  $V_{1a}$  és  $V_{1b}$  receptorok aktiváltak [101]. Mivel a CIB kezelések hatására a vérplazma AVP szintek szignifikánsan a kontroll szint fölé emelkedtek (20. ábra), ami a V-R (AVP receptorok) aktivációjával jár, így a kapott eredményünk fiziológiai szinten is értelmezetté vált.

A plazma AVP szintek emelkedése igazolt szorongásos kórfolyamatokban [102]. Az adat, miszerint szorongásban szenvedő egyéneknél magasabb a koszorúér betegség megjelenési kockázata [106], alátámasztja kapott eredményünk kardiovaszkuláris vonatkozásait is.

A felfedező aktivitás, kíváncsiság rendkívül fontos viselkedési elem a vitalitás és következményesen a társas kapcsolatok szempontjából. A CIB kezelések szignifikánsan (21/B. ábra) csökkentették ezt a viselkedési mintázatot. Mindez összefügg a szorongással és stresszgenerálással is. Mivel a stressz elemek szerepet játszanak az érszűkület megjelenésében [60], ez a CIB kiváltotta hatás is erősíti az ED vegyületek kardiovaszkuláris vonatkozásait.

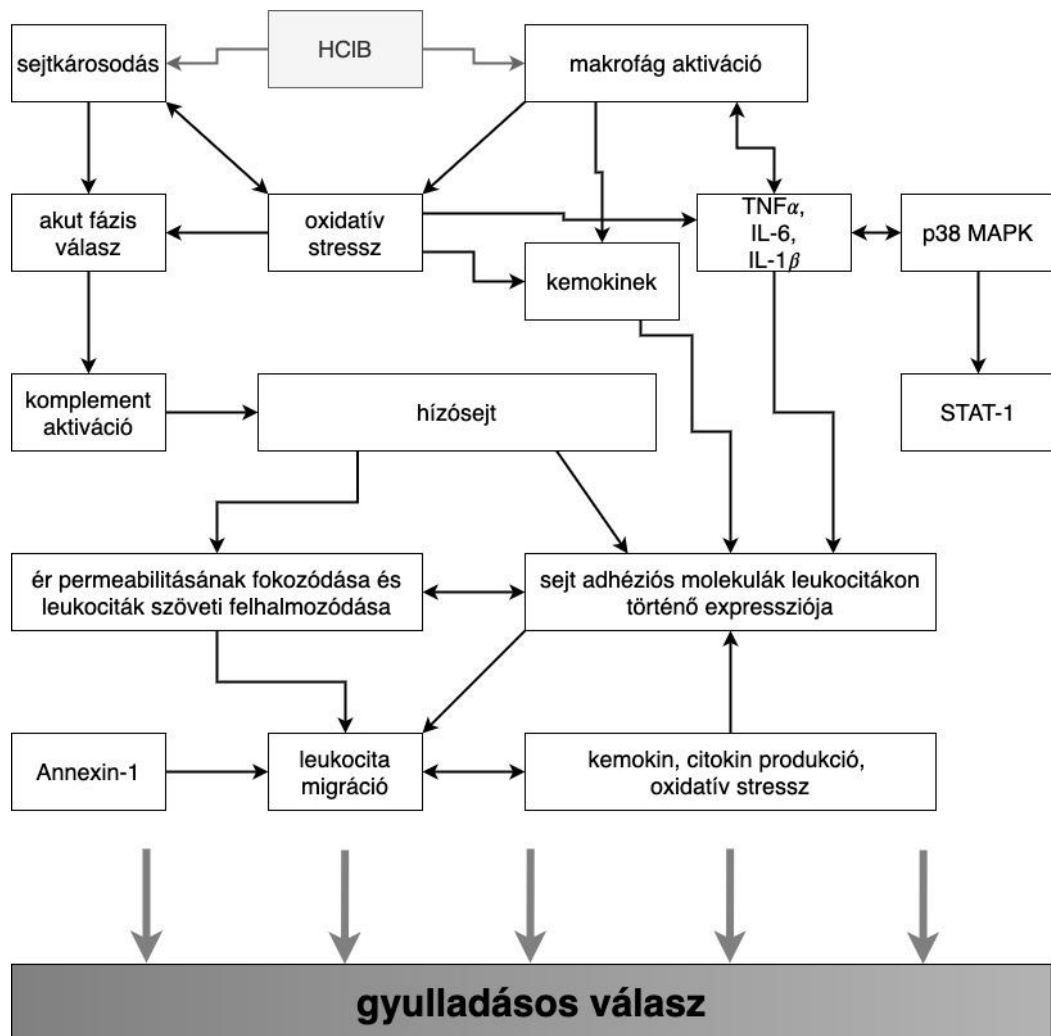
Kissé visszakanyarodva a viselkedési eredmények magyarázatához a 20. ábra értelmezésénél nem feledkezhetünk meg arról sem, hogy *in vivo* CIB jelenlétben az OT vérplazma szintje emelkedett, ami viszont anxiolitikus hatású. A viselkedésvizsgálatok

szerint az AVP/OT hatások eredője a szorongásos viselkedési elem vonatkozásában AVP hatásdominanciát mutat. Ennek a megállapításnak a biztonságát EMP vizsgálati metodikával is igazolni kívántuk, amikor is a szorongást és a lokomócióval kifejezhető exploratív viselkedést tovább tanulmányoztuk (22. ábra). Az EPM vizsgálatokkal kapott eredmények támogatták azt a felismerést, hogy a CLB szorongás fokozó és az exploratív viselkedést szignifikánsan redukáló hatású.

Az *in vivo* CLB kezelések offenzív viselkedési elemekben megjelenő kifejeződését az RI módszerrel határoztuk meg. A támadások, üldözések szignifikáns fokozódása mutatta (23. ábra), hogy CLB hatásra erősen megemelkedik az agresszív viselkedési mintázat. Mindez összefüggést mutat azzal, hogy a szociális magatartási formákban, így az agresszióban is megjelenik az AVP domináns szerepe [231]. Irodalomból ismert, hogy a cerebropinális folyadék AVP tartalma, valamint a személyiségzavaros kórképet mutató betegek agresszivitása szoros kapcsolatot mutat, ami összefügg továbbá az 5-HT-erg aktivitás emelkedésével is [103]. Amikor emelkedett az AVP-erg neuronszám az anterior hipotalamuszban akkor experimentálisan igazolt agressziót tapasztaltak [104]. Az OT kapcsolata az agresszióval szintén kimutatott [123], miszerint a centrális OT tartalom csökkenése agressziót indukál.

A CLB hatótényezők kimutatott nED hatáseredményei azok potenciális kardiovaszkuláris diszruptor szerepének bevezetését is megalapozták, amit az általuk kiváltott jelentős oxidatív stressz igazol. A szakirodalom szerint a CLB-ok hatékony reaktív oxigéngyök-képzők (ROS) [197]. Ennek értelmezésében további szerepet kap a CLB ágensek metabolizmusa, amelyben a klórszubsztituált benzo- és hidrokinonok vizes közegben erős OH-gyökképzést prezentálnak [198].

Az oxidatív stresszor CLB hatás következményesen gyulladásokhoz és apoptozishoz vezethet. Mindkét mechanizmus dominánsan hat a vazotónust reguláló folyamatokra (37. ábra).



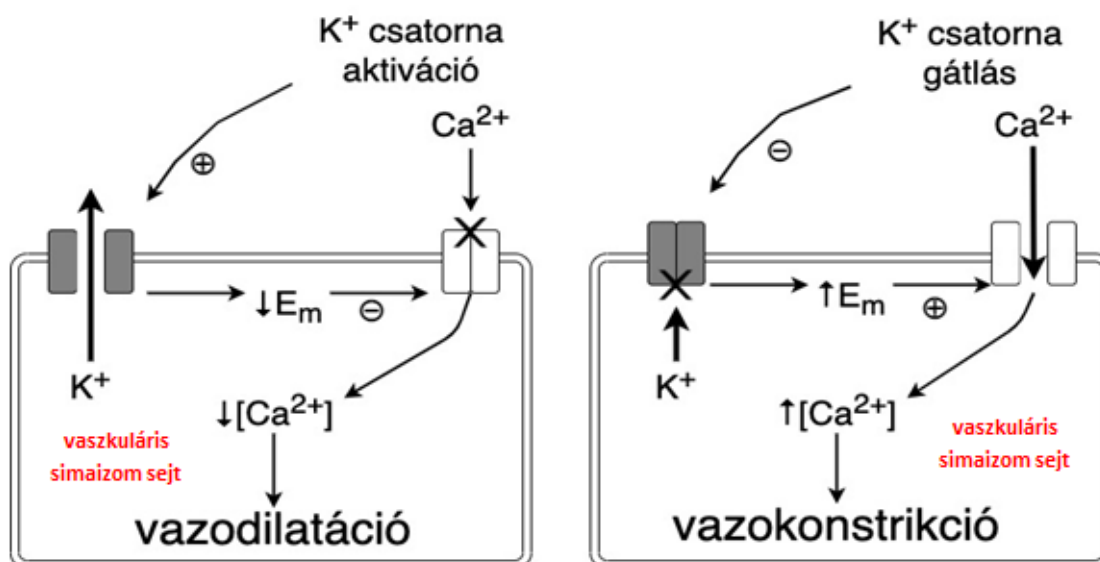
37. ábra HCIB okozta gyulladásos válasz és mechanizmusa [234]

A HCIB makrofág aktivációt indukáló és citotoxikus hatásával reakciók láncolatát indítja be, amely során immunsejtek aktiválódnak, pro-inflammatorikus citokinek és egyéb mediátorok (akut fázis fehérjék, komplement rendszer, reaktív oxigén gyökök) szabadulnak fel szöveti gyulladást eredményezve. **HCIB**: hexaklórbenzol, **TNF- $\alpha$** : tumor nekrosis faktor alfa, **IL-6**: interleukin 6, **IL-1 $\beta$** : interleukin 1 béta, **p38 MAPK**: p38 mitogén aktivált protein kináz, **STAT-1**: szignál transzducer és transzkripció aktivátor-1

A 3. célkitűzési pontban a közvetett ED hatások tanulmányozására az extracelluláris ionmillieu változásaival szimulált állapotokat vizsgáltuk. Ismert a szív/érrendszer egészséges működésében az optimális extracelluláris  $[K^+]$  domináns szerepe, ami gyorsan változhat pl. toxikológiai események (hányás, hasmenés stb.) esetén. Továbbá jól ismert a HMT szabályozási zavar eredményeként fellépő ionmillieu zavar, ami érinti  $[K^+]$ -t is. Így a kutatási protokollban a hipokalémia által kiváltott endokrin események tanulmányozása klinikai vonatkozásai okán is indokolt. A vazotónusban jelentős a szerepe, hiszen a vaszkuláris simaizomsejtek hiperpolarizációja relaxációt, depolarizációja vazokonstriktiót okoz [146]. További közölt adat, hogy a simaizomsejt-endotél egység membránpotenciál változásokra parakrin vazokonstriktor



vagy vazodilatátor mediátorokat expresszál. A vazotónus szabályozását a simaizomsejtek hiperpolarizációján keresztül az endotél eredetű hiperpolarizációs faktorok szabályozzák, amelyben az extracelluláris  $[K^+]$  és az endotél/simaizomsejt membrán  $K^+$ -csatornáinak van döntő szerepe [147]. A lokális  $[K^+]$  csökkenés vazokonstrikciót, az emelkedés vazodilatációt [148] eredményez (38. ábra).



**38. ábra** A  $[K^+]$  csatorna funkciók és a vazotónus kapcsolata [146]

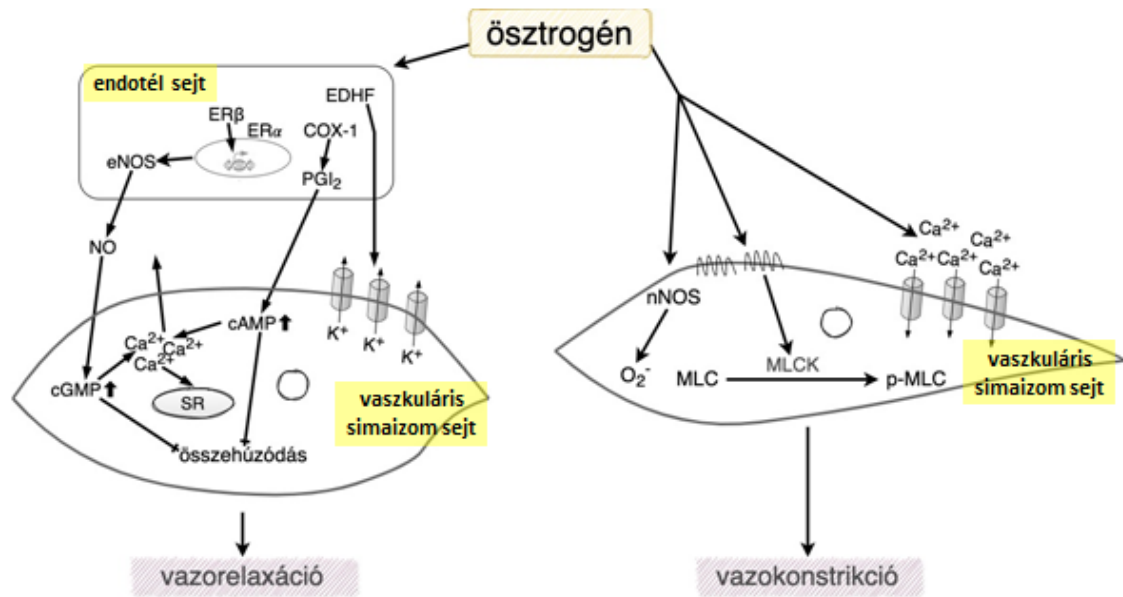
A kálium csatorna aktivációjával  $K^+$  ion áramlik ki a sejtől, ennek következtében a sejt hiperpolarizálódik. A folyamat eredményeként a feszültség függő  $Ca^{2+}$  csatornák záródásával csökken az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$ , mely vazodilatációt eredményez. A  $K^+$  csatornák gátlásával a sejt depolarizálódik, melynek következtében a feszültség függő  $Ca^{2+}$  csatornák nyitásával  $Ca^{2+}$  influx valósul meg. A megnövekedett intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  vazokonstrikció kialakulását segíti elő.  $E_m$ : membrán potenciál

Ezek a tények különösen indokoltá tették az érszűkület és aneurizma szempontjából is a  $[K^+]$  extracelluláris változásainak követését, ami gyakori közvetett expozítorhatás. A standardizáltan kialakított *in vitro* kísérleti protokollban (módszerek 7.2.3) egészséges (AdH) és prolaktinomas adenohipofízis (PRLOMA) sejteken került tanulmányozásra az extracelluláris 0-2,0 mM  $[K^+]$  változások hatása az ACTH és PRL elválasztás vonatkozásában. A 24. ábra szerint az AdH kultúrában a kontroll ACTH elválasztási kinetikához viszonyítva az extracelluláris hipokaliémia hatására kompenzált folyamat érvényesül az első 30 percben az 1,5 mM  $[K^+]$  kezelés kivételével minden csoportban. A 40-50 perc közötti időintervallumtól a 0,0 mM  $[K^+]$  hatására extrém magas ACTH mennyiséget detektáltunk a sejt kultúrák felülúszó médiumaiban. Amikor azonos kísérleti protokoll szerint, de PRLOMA rendszerben vizsgáltunk; az esszenciális ACTH elválasztás karakterisztikájában a 0,0; a 0,5 és 1,0 mM  $[K^+]$  esetén is

dekompenzált ACTH release-t mértünk a 60. perctől. A 2,0 és 1,5 mM  $[K^+]$  kezelésnél a PRLOMA kompenzáltan, kontroll közeli állapotban tartotta az ACTH elválasztási funkciókat. Az AdH PRL elválasztásában is a 0,0 mM  $[K^+]$  Tyrode jelenlétében 60-70 perces kezelés után tapasztaltunk dekompenzált funkciót. PRLOMA esetén a 0,0 és 0,5 mM  $[K^+]$  hatására vált dekompenzálttá a PRL release karakterisztikája. Mind az ACTH, mind a PRL elválasztásban erősen eltérő karakterisztikákkal válaszoltak az AdH és PRLOMA modellek a hipokalémiás hatásokra. Amennyiben az ED/nED hatásra alacsony extracelluláris  $[K^+]$  jelenik meg, akkor az ehhez való alkalmazkodási potenciál az egészséges és „beteg” sejtek vonatkozásában erősen eltér, ami további zavarmechanismusokat generálhat.

Mivel munkacsoportunk az ED hatások keresését tartotta eleinte elsődleges céljának, így a PRLOMA modell ED jelentőségét az is alátámasztotta, hogy a prolaktinomás adenohipfízis egy endokrin szabályozási zavarral - extra ösztron-acetát kezeléssel - került kiváltásra. Így feltételezhetően minden olyan kémiai környezeti hatás, amelyben az ER (ösztrogén receptor) hiperaktivációját fel tudjuk tárni, eredményeiben ED hatást hordozhat.

Az ER-k az érspazmus és aneurizma szempontból is jelentősek, mert hatásuk kettős: vazorelaxáns és vazokonstriktív. Az érrendszeri ösztrogénhatások kulcsszereplője az endotélium és annak integritása, amely meghatározza az ösztrogének vazokonstriktív vagy vazorelaxáns hatásait [235]. Mindez még inkább felhívhatja a figyelmet minden olyan jellegű hatótényezőre (pl. a fogamzásgátlás, egyéb ER-agonista jellegű ágensek alkalmazása esetén), amely ösztrogén-receptor érintettsége okán sejtszintű funkcionális vagy strukturális zavarral járó expozíciókat jelenthet. Ezek komoly rizikó faktorokat képviselhetnek a vazotónus szempontjából is (39. ábra).



39. ábra Ösztrogén vazotónust szabályzó mechanizmusai [196]

Az ösztrogén az egyensúlyi vazotónus szabályozását vazodilatatív és vazokonstriktív mechanizmusokkal tartja fenn. Az ösztrogén a simaizomsejt ellazító hatását endotélben keresztül fejt ki, melynek során az endotélben a nukleáris (ERα és ERβ) receptorokon keresztül fokozza az eNOS expresszióját és a NO szintézisét. Közben COX-1 aktiváláson át fokozza a PGI<sub>2</sub> elválasztást és serkenti az endotél EDHF szekréciót. A felszabaduló parakrin mediátorok közül a NO és PGI<sub>2</sub> a simaizomsejt intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának csökkentésével, az EDHF pedig a K<sup>+</sup> csatornák aktiválásával és a következményes hiperpolarizáció révén vezet simaizom ellazuláshoz. Az ösztrogén simaizomsejten kifejtett direkt hatása simaizom összehúzódást eredményez, melynek kulcslépése az MLC foszforilációja: (1) A simaizom G-proteinhez kapcsolt sejtmembrán ösztrogén (GPER) receptorok aktivációja az MLC-kináz defoszforilációjával fokozza az enzim Ca<sup>2+</sup> érzékenységét, mely elősegíti az MLC foszforilációját (2) Ca<sup>2+</sup> csatornák aktiválásán keresztül fokozza a Ca<sup>2+</sup> influxot, amely az MLC foszforilációjához vezet (3) a simaizomsejt által expresszált nNOS „un-coupled” formája ösztrogén stimuláció hatására NO helyett szuperoxid gyököt képez. Ez utóbbi tovább rontja a NO biológiai aktivitását, amely a vazotónus fokozódását eredményezi. **ERα**: nukleáris ösztrogén receptor alfa, **ERβ**: nukleáris ösztrogén receptor béta, **eNOS**: endoteliális nitrogén oxid szintáz, **COX-1**: ciklooxygenáz 1, **PGI<sub>2</sub>**: prosztaciklin, **EDHF**: endotél eredetű hiperpolarizációs faktor, **cGMP**: ciklikus guanin monofoszfát, **cAMP**: ciklikus adenosin monofoszfát, **SR**: szarkoplazmás retikulum, **nNOS**: neurális nitrogén oxid szintáz, **MLC**: miozin könnyű lánc, **MLCK**: miozin könnyűlánc kináz, **p-MLC**: foszforilált miozin könnyűlánc

A hipokalémiás kísérletek dekompenzált eseteihez rendelhető celluláris mechanizmus feltárása (28. ábra) során immunhisztokémiaileg igazoltuk a háttérben jelenlévő apoptotikus eseményeket. A PRLOMA modellben ez kifejezettebb volt, ami alátámasztja az egészséges és „beteg” sejtek közötti különféle stresszre adott válaszkülönbségeket. A nED hatású CIB vagy fenilurea vegyületek ROS generálásán keresztül váltanak ki apoptozist, amivel lokális ionegyensúly zavarokat is okozhatnak. Ez következményesen a membrán hiperpolarizációját vagy depolarizációját eredményezve a vazotónus zavarát okozhatja.

A célkitűzés 4. pontban az experimentális tapasztalatok felhasználásával a vizsgált ED/nED expozitorok kardiovaszkuláris rendszert érintő lehetséges hatásait kívántam feltérképezni a biológiai rendszerhálózati kapcsolatok feltárásával. A környezeti hatások által okozott funkcionális eltérések közül a koszorúerspazmust vizsgáltam, mely környezettudományos megközelítéssel kardiovaszkuláris „kiszavar”-ként fogható fel [236]. Az irreverzibilis, környezettudomány által „strukturális zavar”-ként definiált eltérések közül az aortagyöki aneurizmák ritka fajtáját, a Valsalva tasakokból kiinduló aneurizmat tanulmányoztam.

Differenciáldiagnosztikai szempontból a funkcionális koszorúéreltérés (spazmus) diagnózisának felállítását megelőzően szükséges a strukturális, már fixálódott jelentős érszűkület lehetőségének kizárása. Ennek érdekében végzett invazív beavatkozás (29. ábra) az RDA hemodinamikailag nem jelentős strukturális szűkületét igazolta, mely azonban a kapott eredmény alapján önmagában tünetokozó nem lehetett. A látott morfológiai kép és a klinikum felvetette a tranziens érszűkület (spazmus) lehetőségét, melyet a kórelőzményben szereplő dohányzás, amit a specifikus orvos szakmai ajánlások szerinti környezeti tényező szerepe, erősen támogatott [44,45,60]. A szakirodalom szerint ugyanis, a dohányfüst gáz- és korpuszkuális komponenseinek szabadgyök tartalma, továbbá több ezer komponensének metabolitja a szervezetben további ROS komponensek generálásával hozzájárul az egyedben az oxidatív stressz kialakulásához [175]. Ismert, hogy a szervezet egészséges működésében a szabad gyökök és az antioxidánsok egyensúlya meghatározó [237], de amikor ROS képző expozitorok jelennek meg, akkor ezek ezt a kényes és szükséges egyensúlyt eltolják a ROS javára, ami következményesen az endotélben az eNOS gátláson keresztül (5. ábra) a NO szintézist akadályozza és ez vazokonstriktiót generál [154]. Experimentális vizsgálataim alapján, a CIB-ok révén ismertem a ROS mediált eseményeket, hiszen a CIB-k is jelentős reaktív oxigéngyök képzők. A CIB-ok főként a szervezetben megjelenő metabolitjaik révén (6. ábra) fejtik ki ROS induktor hatásukat [197]. Ezek tudatában tranziens vazospazmus gyanújával további vizsgálatokat indikáltam. A koszorúerspazmus direkt kimutatására a szakirodalomban elfogadott invazív provokációs (ergonovin vagy acetilkolin) teszt [238] elvégzésétől magasabb kockázata miatt eltekintettem, helyette a biztonságos, de a szakmai ajánlásoktól eltérő nagy felbontású intravaszkuláris képalkotó eljárást (OCT vizsgálatot) [239] alkalmaztam a spazmusra hajlamosító indirekt jelek vizualizálására. Ennek eredményeként (30. és 31. ábrák) feltárára kerülhetett az érlumenben lapszerűen elterülő szervült trombus és annak pontos pozíciója. A vizsgálat további fontos felismeréshez

vezetett: a trombustól distalisan endotél lacerációkat (31/B. ábra) azonosított. Számomra ez az eredmény várható volt, hiszen az experimentális tapasztalatok alátámasztották, hogy amennyiben az endotélsejtek találkoznak a dohányzásból származó hatótényezőkkel (vagy ED vegyületekkel), akkor azok különböző faktorok ([240]: pl. TNF, IL-6, IL-8, IL-10; IL-18 [241]), CRP [164]) mediálásával gyulladást, továbbá apoptotikus folyamatokat generálhatnak [242]. Az így felszabaduló TNF- $\alpha$  [243] az MMP szint emelkedésével lokális kollagén és extracelluláris mátrix zavart eredményezhetnek [183]. Tehát, az endotél diszstrukturális eltérése - a hatótényező ROS aktiválta folyamatainak következtében - az, ami megváltoztatta az RDA lumen felé eső felszínét, ez pedig támogatta a trombociták kitapadását [244], amelyek aktivációjával felszabaduló parakrin mediátorok (pl. 5-HT) hozzájárulhatnak az ér fokális spazmusához. A funkciójában és strukturálisan károsodott érszakasz sztenttel került áthidalásra a további spazmos események megelőzése érdekében. Az ED/nED hatótényezők kiváltotta lehetséges diszfunkciós és diszstrukturális mechanizmusok az érspazmusban domináns szerepűek. Jelen spazmos esemény során, a reverzibilis fázison túljutott „kiszavarral” találkoztunk, amit az érfal felrostozódása, mint kezdődő strukturális zavar is alátámasztott. Mindez a terápiában fontos támpontot jelentett a sztent pozíciójának megválasztásában.

A bal Valsalva tasakból kiinduló aorta gyöki aneurizma morfológiáját (cél 4a/2) non-invazív multi-detektoros CT vizsgálattal tisztáztam (32. ábra). Ennek során felismerésre került a bal koszorúér kezdeti szakaszának az aneurizma által okozott szívciklussal szinkron, dinamikus, életet veszélyeztető kompressziója. Fontos volt a beavatkozásokat megelőző ismereteim szempontjából, hogy a beteg dohányzó és a jelen panaszait megelőzően trauma következtében szepszis utáni állapotban volt. Mindez arra hívta fel a figyelmet, hogy gyulladásos folyamatokkal [180] és azok során felszabaduló faktorokkal (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-23 és IFN- $\gamma$ ) [183], valamint fokozott ROS képződéssel és apoptotikus háttérfolyamatokkal állok szemben [199]. Életveszély okán sebészeti beavatkozásra, műbillentyű behelyezésére és a komprimált érszakasz áthidalására volt szükség (32. ábra). A műbillentyű implantációval járó műtét megerősítette az aorta gyök és natív billentyű krónikus gyulladását. A műtét a komprimált érszakasz áthidalása mellett az aneurizma keringésből való kirekesztését célozta annak rezekciója nélkül. A műtét hosszú távú eredményessége a megelőző krónikus gyulladásos folyamatok és a dohányzás miatt számomra kétségesnek mutatkozott, amit a gyulladás okozta varratelégtelenség, valamint az aneurizma falának

a gyulladás által fenntartott folyamatos strukturális degenerációja igazolt. Emiatt az aneurizma valóban tovább progrediált, amit az 32/B és 32/C, valamint 33/A ábra szerint multi-detektoros szív CT angiográfiás felvétellel igazoltam. Az aneurizma által körbevett érszakasz dinamikus kompressziójának fokozódásából származott a beteg panaszainak visszatérése és erősödése, annak ellenére, hogy azt bypass graftokkal előzőleg áthidalták. A dinamikus kompresszió tényét morfológiailag az angiográfia (33/B. és 33/C. ábra) és az intravaszkuláris UH vizsgálat (33/D. és 33/E. ábra) igazolta, funkcionális jelentőségét (az iszkémiát okozó hatását) pedig a frakcionális flow rezerv [245] (FFR) vizsgálat mutatta ki (34/A. ábra – FFR: 0,52). Az iszkémia kezelésének megoldásaként a bal koszorúér közös törzsébe sztent került behelyezésre, mintegy belülről megtámasztva a kívülről komprimált érszakaszt. A beavatkozás funkcionális eredményességét kontroll FFR vizsgálat (34/B. ábra - FFR: 0,91) igazoltuk. Bár ezt követően megszűnt a bal közös törzs külső, aneurizma okozta kompressziója (35. ábra) és a beteg panaszmentessé vált, az aneurizma azonban továbbra is jelen maradt, ami számomra az ED/nED hatások ismeretében a későbbi események lehetséges megjelenését sugallja.

Experimentális munkám tapasztalatai, az ED hatások univerzális hálózati biológiai csomópontjainak feltárása révén az érszűkület és aneurizma diagnózisa és kezelése kapcsán is új megközelítéseket biztosítottak. A vazotónus zavarát okozó hatások vizsgálata során feltártam, hogy a koszorúérszűkülettel járó betegségek diagnosztikájával és terápiás javaslataival foglalkozó európai-, észak amerikai- és japán szakmai kollégiumok ajánlásaiban a környezeti tényezők patoetiológiai szerepe alulreprezentált. Ugyan az európai és amerikai ajánlás a dohányzást, a japán ajánlás a dohányzás mellett az alkoholfogyasztást is megemlíti, de amellett számos környezeti faktorról egyáltalán nem tesz említést, annak ellenére, hogy világviszonylatban megváltozott a környezeti terhelés, akár a természetes akár az urbanizált [1,2,3] dimenziókra gondolunk. Mindennapos információink között szerepel a levegő-, víz- és talajterhelések aggasztó volta [246]. A három környezeti elem valaha létezett - sajnos általunk már nem tapasztalt - természetes állapota melletti evolúcióban alakultak és fixálódtak a biológiai anyagmintázatok megjelenési formái (így a humán is). A természetes evolúciós szereplők alkalmazkodási potenciálja, ma már nem minden helyzetben képes biztosítani az organizmusok működési stabilitását a nem természetes környezeti feltételek mellett. A megváltozott feltételekhez való alkalmazkodás során a korábbiaktól eltérő folyamatok jelentek meg, amelyek eleinte csak biokémiai (pl. zsírsavanyagcseré eltérések), majd funkcionális (pl. érszűkület) zavarokat indukáltak. Ezek

az állapotsávok reverzibilis tartományokkal indulnak, melyeket a környezettudomány „kiszavar”-ként tart számon. Amikor viszont a funkcionális eltérések fixálódását a struktúra is támogatja, azaz a hosszan fennálló feltételváltozások krónikus gyulladásos, majd transzformációs és egyéb jól karakterizálható morfológiai eltéréseket (pl. aneurizma) okoznak, akkor az már irreverzibilis, és a tudomány „strukturális” zavarként írja le ezeket. A „kis- és strukturális zavarok” ismerete az orvosi gyakorlat számára egy-egy betegség diagnosztikájának, progressziójának vagy a terápiás megoldásainak tervezését és végrehajtását is meghatározza. Amikor kimondjuk egy kórcsoportról, hogy az nagy gyakoriságú, biztosan nem hagyhatjuk figyelmen kívül a környezeti tényezőket, amiket szakkifejezéssel hatótényezőknek nevezünk. A kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikájának és kezelésének nemzetközi ajánlásaiban [44,45,60] mégsem találtam meg a napjainkra jellemző környezeti terheléseket, mint kóroki tényezőket. A nagy xenobiális környezetterhelő ágens csoportok az iparból [247] a mezőgazdaságból [248], a közlekedésből [249], stb. származó környezeti terhelésekről nincs említés. Pedig ahogyan ez a megközelítés az endokrin szabályozást érintő, vonatkozó orvosi ajánlásokban már kibontakozóban van, úgy az elengedhetetlenül szükséges lenne kardiovaszkuláris tekintetben is.

Így jelen dolgozattal szeretném bevezetni a *Kardiovaszkuláris Diszruptor Vegyület* (KvDV) fogalmát, amely alatt azokat a környezeti hatótényező ágensnek értem, amelyek a kardiovaszkuláris betegségcsoportok megjelenésében, fenntartásában napjainkban domináns szerepűek. A Kardiovaszkuláris Diszruptor (KvD) hatások kiváltói lehetnek kémiai (ágensek), fizikai (pl. elektro-mágneses mezők, hideg hatás) és biológiai (pl. mikrobiális organizmusok) hatótényezők. Ebben a dolgozatban a KvDV-k, mint hatótényezők az EDC kiváltotta mechanizmusok igazolásával, továbbá mint neuroendokrin és kardiovaszkuláris együttes csomópontok kerültek meghatározásra (organizmus és celluláris szinten).

A kísérleti és klinikai munkám eredményeit összegezve a következőket állapítottam meg. Az experimentális vizsgálatokkal celluláris és organizmus szinten közvetlen hatótényező/hatás vizsgálatok eredményei igazolták, hogy valóban ED hatásúak a dClB, a mClB, a PU, MU és DU. Továbbá, a monoamin aktivált neurohipofízis vizsgálatok eredményei révén kiterjedtebb, nED hatásokat is tulajdoníthattam ezeknek a vegyületeknek. *Megállapítottam, hogy a vizsgált ágensnek nED hatásai olyan hormon elválasztási zavarokat generáltak, amelyek potenciálisan szoros kapcsolatot mutathatnak érszűkület megjelenésével.* Az összefüggést a homeosztázisban csomóponti szerepet



játszó hormonvolumenek változásainak celluláris (homon-release funkciók) és organizmus szintű hatásaival (pl. viselkedés) igazoltuk.

Az ED hatásokat *sejtszinten* tisztázó experimentális vizsgálatokban az esszenciális ACTH és AVP, valamint a nem esszenciális, de komplexitási szinten domináns hatású PRL és OT szerepére fókuszáltunk, mint az endokrin szabályozás fontos csomópontjaira. Továbbá a monoaminok (NA, 5-HT) szabályozta AVP és OT elválasztásokban is igazoltuk a ClB diszruptor szerepét, így azt neuro-endokrin diszruptor (nED) hatásnak tekinthetjük. A HMt modellben kialakított szabályozási kör szimulációjával is bizonyítottuk a nevezett hatótényezők erős nED jellegét. A HMt működés kardiovaszkuláris vonatkozásai kapcsán felvettem az ACTH potenciális kardiovaszkuláris hatáshordozó szerepét is, a *szív melanokortin receptorai révén*. Ez az ACTH vonatkozásában főleg akkor, válik kifejezetté, ha a fiziológiásnál *magasabb az ACTH koncentráció*, mint pl. a kísérletesen igazolt ClB ED hatásaiban, ekkor viszont ez a *közvetlen ED hatás egy közvetett Kardiovaszkuláris Diszruptor (KvD) hatásként* jelenik már meg.

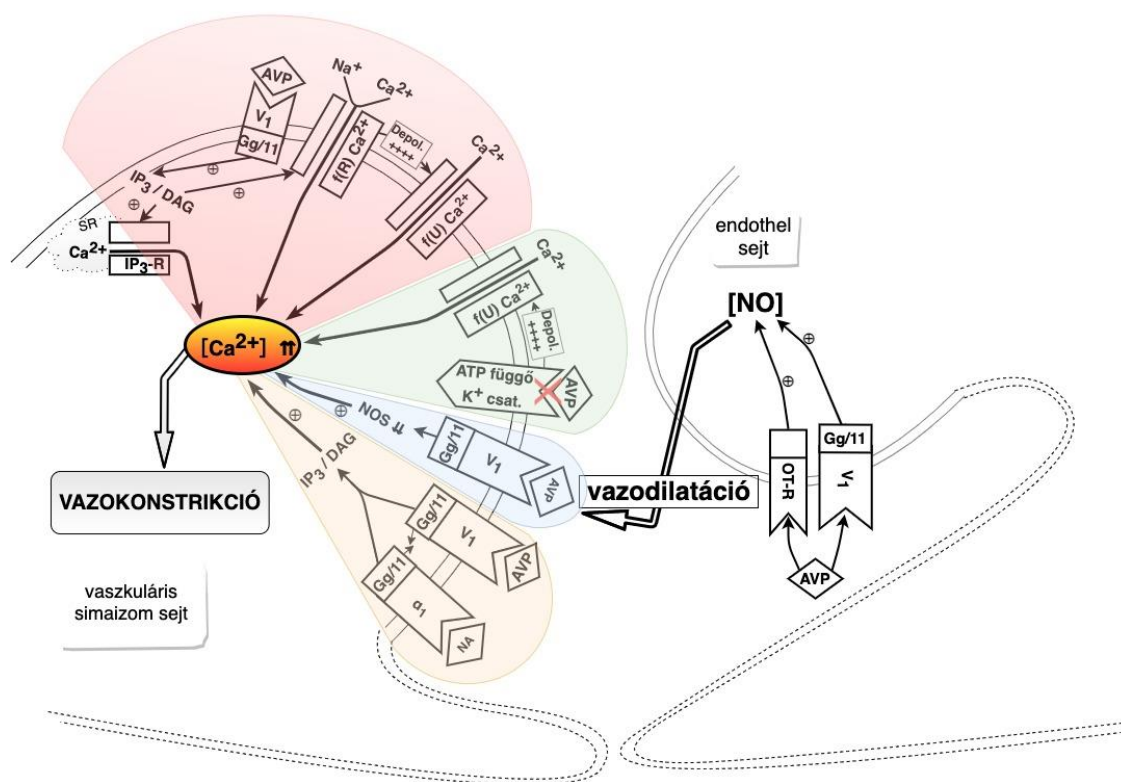
A PRL celluláris szintű regulációban közvetetten a NO/NOS rendszeren keresztül fejti ki KvD hatásait (Bevezetés 4.1.5).

Az ED események során, a celluláris szintű szabályozásokban a ClB oxidatív stresszor szerepe dominál elsődlegesen a közvetlen hatásokban (6. ábra). Hasonlóan ROS generálta események jelennek meg a fenilurea ágenseknél is (Bevezetés 5.2). További felismerés, hogy az *nED vegyületek potenciális KvD hatásait a ROS mechanizmuson keresztül meginduló gyulladásos folyamatok* - az érintett szövetekben -, közvetlenül kiváltják. Ekkor a ROS indukálta pl. citokin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ ) felszabadulások, a kemokinek, az érfalak permeabilitási zavarai vezetnek a következményes gyulladásához (37. ábra). De a HCIB és metabolitjai szintén a ROS-on keresztül indukálják az apoptosist és ferroptosist is (7. ábra).

A kutatási protokollokban a dClB, mint hatótényező bevezetése is megtörtént (10. és 15. ábrák), ennek indoka, hogy a biológiai mintarendszerekben észlelt számos környezeti tényező kiváltotta hatáseredmény összehasonlíthatósága nagy gondot jelent. A szakirodalom szerint igen sok módszerrel és vizsgálati körülmény mellett történnek a kutatások eltérő biológiai rendszerszinteken. A nagy adatmennyiség optimális felhasználását teszi lehetővé az LCA 14040 szabványcsomag, ami az eltérő feltételek és metodikák mellett vizsgált kutatási eredményeket olyan módon standardizálja, hogy egy plusz mintarelációt vezet be a dClB hatásvizsgálatával. A kutatások során, a többi

mintával azonos rendszerben kezelt dCIB hatás megadásával lehetséges a szabványos standardizálás, ami az *ÖTP*, és a *HTP* kifejezését teszi lehetővé. A bemutatott vizsgálatokban már mi is bevezettük ennek a standardizálási lehetőségnek a használatát, azért is, hogy adatbázist tudjunk strukturáltan építeni és azt több összefüggés kutatásában kezelni, valamint adataink mások számára is jól értelmezhetően felhasználhatóak legyenek. Így a *KvD hatás tekintetében is alkalmazható nemzetközi standardrendszerhez csatlakoztunk a dCIB hatáskutatásával.*

Az **organizmus szinten** a CIB vegyületek jelenlétében az AVP és OT szerepét vizsgáltuk mint neuroendokrin szabályozási csomópontokat. Megállapíthattuk az organizmus szinten is manifesztálódó ED hatásokat, melyekhez kötötten feltárássra kerültek a KvD eseménykaskádok (40. ábra).



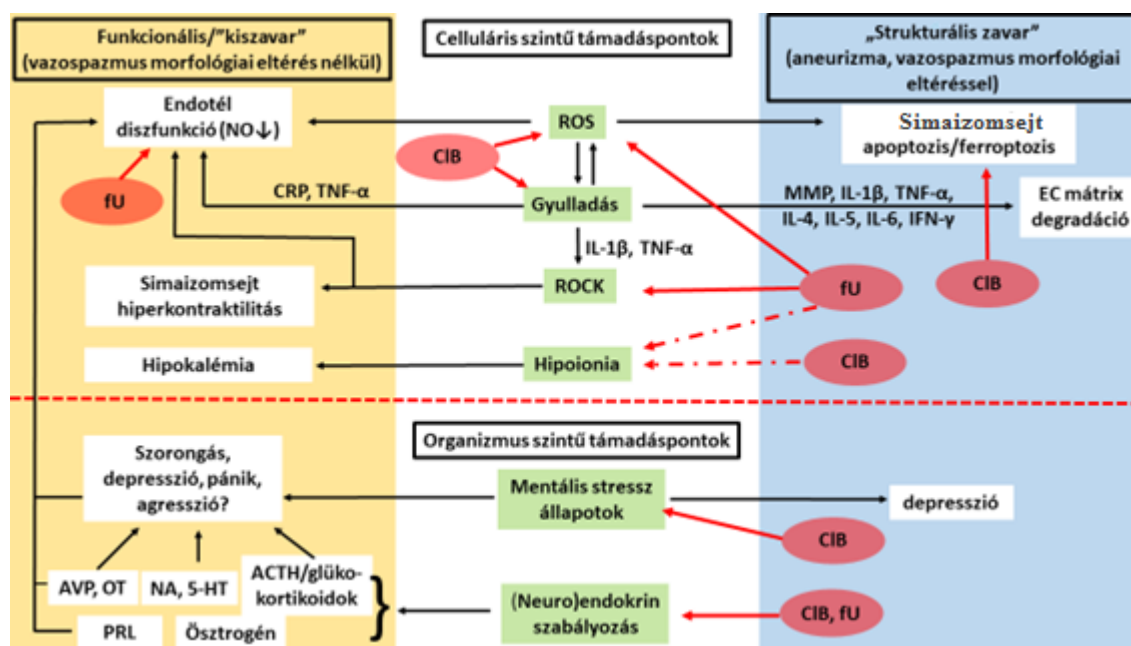
**40. ábra** Az erek endotél-simaizom funkcionális egység AVP mediált működésszabályozási eleme a vazokonstriktióban

Az AVP simaizomsejteken kifejtett vazokonstriktós hatása az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint fokozódásán keresztül 4 mechanizmussal valósul meg. (1) Gq/11 fehérjéhez kapcsolt  $\text{V}_1$  receptorok aktivációjával  $\text{IP}_3/\text{DAG}$  másodlagos messengerek keletkeznek. Az  $\text{IP}_3$  az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárként funkcionáló SR membránján található  $\text{IP}_3\text{-R}$ -hoz kötődve  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulását eredményez, a DAG pedig a plazmamembrán  $f(\text{R})\text{Ca}^{2+}$  csatornákon a  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok beáramlásával és a sejt következményes depolarizációja által aktivált  $f(\text{U})\text{Ca}^{2+}$  csatornákon keresztül további  $\text{Ca}^{2+}$  ionok beáramlása hozzájárul az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint fokozódásához. (2) ATP függő  $\text{K}^+$  csatornák direkt gátlásával, valamint következményes sejt depolarizációval és  $f(\text{U})\text{Ca}^{2+}$  csatornák aktivációjával fokozott  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás alakul

ki. (3)  $V_1$  receptorok aktivációja a NOS expressziójának gátlásán és NO szintézisének csökkenésén keresztül vezet intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint emelkedéshez. (4) Egyéb vazokonstriktorok (pl NA) hatásának potencírozásával, mely a receptorokhoz ( $\alpha_1$ -R és  $V_1$ -R) kapcsolt Gq/11 fehérjék interakciója révén aktiválódó  $IP_3/DAG/Ca^{2+}$  szignalizáció útján jön létre. Az AVP vazodilatációs hatását az endotél sejtek OT-R és  $V_1$  receptorai mediálják NO szintézisének fokozásával. **AVP** – arginin-vazopresszin, **NA** – noradrenalin, **NO** – nitrogén-monoxid, **NOS** – nitrogén-monoxid szintáz,  **$V_1$**  receptor – vazopresszin 1 receptor, **OT-R** – oxitocin receptor,  **$IP_3$**  – inozitol-3-foszfát, **DAG** – diacil-glicerol, **SR** – szarkoplazmás reticulum,  **$IP_3$ -R** – inozitol-3-foszfát receptor,  **$f(R)Ca^{2+}$**  - receptor függő  $Ca^{2+}$  csatorna,  **$f(U)Ca^{2+}$**  - feszültség függő  $Ca^{2+}$  csatorna,  **$\alpha_1$**  – alfa1 adrenoreceptor

Az esszenciális AVP és az OT elválasztási zavar, amit az ED hatótényezők okoztak, mind celluláris, mind (plazma hormontartalmukban, viselkedési elemek változásában) organizmus szinten igazoltta váltak, ami alátámasztotta releváns klinikai vonatkozásait (4b célkitűzés).

Megállapíthattam a fentiek ismeretében, hogy a vizsgált ágensek (fenilurea ágensek és CIB-ok) potenciálisan KvD tulajdonsággal rendelkeznek, amit organizmus és celluláris (exocitotikus, apoptotikus) szabályozási csomópontokon keresztül fellépő hatásokkal igazoltam (41. ábra).



**41. ábra.** ED/nED hatótényező klórbenzol és uron vegyületek KvD támadáspontjai celluláris és organizmus szinten

A CIB és uron vegyületek celluláris és organizmus szintű mechanizmusokkal való direkt és indirekt interferenciája révén funkcionális- és strukturális vaszkuláris zavarok kialakulásában játszhatnak szerepet, így az említett hatótényezők potenciális kardiovaszkuláris diszruptoroknak tekinthetők. **ROS** – reaktív oxigén gyök, **ROCK** – RhoA/Rho-kináz útvonal, **NO** – nitrogén oxid, **AVP** – arginin vazopresszin, **OT** – oxitocin, **NA** – noradrenalin, **5-HT** – szerotonin, **ACTH** – adrenocortikotrop hormon, **PRL** – prolaktin, **CRP** – C reaktív protein, **TNF-alfa** – tumor necrosis faktor  $\alpha$ , **IL** – interleukin, **MMP** – mátrix metalloproteináz, **IFN- $\gamma$**  – interferon gamma, **EC mátrix** – extracelluláris mátrix, **CIB** – klórbenzol, **FU** – fenilurea, **KvD** - Kardiovaszkuláris Diszruptor,

A biológiai hálózrendszerben az organizmus és celluláris szintű szabályozási csomópontokra gyakorolt CLB és uron vegyületek hatásai révén „kiszavar” és/vagy „strukturális zavar” léphet fel, amely különböző súlyosságú vaszkuláris eltéréseket generálhat. A dolgozatban bemutatott esettanulmányok kapcsán, ahol a környezeti hatás szimulációt a dohányzás képviselte, megtaláltuk a ROS kiváltotta, valamint a gyulladásos eseménykaskádót. Ezek az erek funkcionális és/vagy strukturális zavarát okozták koszorúérszűkület vagy aneurizma esetén is (4b célkitűzés).

Jól prezentálhatóvá vált a gyulladással összefüggésbe hozható extracelluláris mátrix eltérés is, ami értelmezhető kémiai környezeti terhelés (dohányzás) hatására megjelenő lokális gyulladásos folyamatként (MMP aktiváción keresztül). Ez az érendotél felrostozódásához hasonló morfológiai elváltozást kiváltva biztosított kitapadási felszínt a trombociták számára. A trombus megjelenésekor a parakrin 5-HT felszabadulás újabb vazokonstriktív eseményeket generált.

A vazokonstriktióban és aneurizmában megjelenő kórképek invazív tanulmányozásakor igazolást nyert, hogy a nevezett csomópontokon keresztül zajló diszruptor folyamatok azonos eredményre vezetnek. Szinonim logikát képviselő megfontolásokkal találkozhattunk az orvostudományban a polietiológiás kórképek kapcsán.

### *Következtetések*

Az alábbiakban a disszertáció új megállapításait mutatom be, dőlt betűvel jelezve önálló új eredményeimet.

#### 1. Kialakításra került a(z)

**a,** *gasztrointesztinális expozíciós út modellezése az ED kémiai hatótényezők kutatásához (csecsemő szonda, standard térfogat, testtömeghez iteráltan) Wistar törzsű patkány-modellen.*

**b,** *állatkísérletesen standardizált prolaktinómás adenohipofízis modell szubkután ösztrolon-acetát implantációval (6 hónapon keresztül, 150 µg/ttg kg/hét, szubkután beültetés).*

**c,** *az expozítorok szubtoxikus dózisainak és kezelési időtartamainak modellezése. Továbbá a celluláris regulációs folyamatkövetésekhez in vitro szabályozási ciklus, neurohipofízis (specifikus monoamin aktivált, specifikus antagonisták gátolt AVP, OT release) és adenohipofízis (hipofízis-mellékvesekéreg tengely: kortikoszteroid gátlás, AVP ko-*

aktiválás, kombinált gátlás/aktiválás ACTH release követés) vonatkozásában.

2. Igazolást nyert közvetlen hatásvizsgálatokban az 1,4 para-diklórbenzol, a klórbenzol mix, a fenuron, monuron és diuron hatótényezők endokrin diszruptor hatása mind a celluláris (exocitotikus aktivitás *in vivo* és/vagy *in vitro* expozíciókra), mind az organizmus (plazma hormonszintek alakulása AVP, OT, ACTH, PRL; viselkedés: szorongás, lokomotoros aktivitás, exploratív funkciók, agresszivitás vizsgálatok) biológiai rendszerszintjén.

**a,** *Az 1,4 para-diklórbenzol hatáseredményeinek bevezetésével csatlakoztunk a szabványos, nemzetközi adatszolgáltatási lehetőségekhez a Humán Toxicitási Potenciál nED hatótényezőinek tekintetében.*

3. Az *in vitro* regulációs ciklusmodellek segítségével megállapítottam a klórbenzolok neuroendokrin diszruptor (nED) hatását, kiterjesztve a korábbi endokrin diszruptor (ED) hatásspektrumot (az AVP, OT monoamin aktiváció /NA, 5-HT/és az ACTH elválasztás szabályozás hipofízis-mellékvesekéreg tengely működés hatótényezők általi szignifikáns zavarásának igazolásával).
4. Igazoltam, hogy az egészséges (AdH) sejtekhez viszonyítva a diszfunkciós (beteg - PRLOMA) sejtek működése eltolt szabályozási ciklusú, amit az ED ágensek tovább erősítenek (dominánsabban jelenik meg az ACTH/PRL regulációs mechanizmusok eltolódása az AdH és a PRLOMA relációiban). Mindez a klinikai gyakorlat szempontjából igen jelentős.
5. *Bizonyítást nyert az AdH sejtek vonatkozásában, hogy az ED hatótényezők, a ClB ágensek szignifikánsan fokozzák a nonmitokondriális  $Mg^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitást.*
6. A közvetett ED hatások modellezésében igazolt, hogy a hipokalémiát - mint a klinikumban gyakran megjelenő (pl. toxicitási) eseményt -, az egészséges AdH sejtek jellegzetes kompenzációval (alkalmazkodási potenciállal) kezelik (dózis és hatásidősáv tekintetében az ACTH és PRL release során). Ezt a diszfunkciós PRLOMA sejtek sem az ACTH, sem a PRL elválasztás tekintetében nem mutatják. A klinikum számára ez újabb bizonyíték az egészséges és beteg sejtfunkciók közötti szignifikáns eltérésekre.

**a,** A hipokalémiás protokollokban észlelt dekompenzált sejtfunkciók hátterének immunhisztokémiai vizsgálattal bizonyított magyarázata az apoptotikus folyamatok zajlása.

7. Kísérletesen igazolást nyert, hogy a ClB hatótényezők, mint lipofil xenobiális modellvegyületek hatáseredményei valóban dózis és időfüggően jelennek meg. Így ezekre csak intraorganizmus szintű küszöböket lehet meghatározni a HTP vizsgálatok során (jelenleg a törvényi szabályozásban terhelési határértékeket adnak meg).
8. *Meghatározásra kerültek az ED/nED ágensek - stratégiai célokként kezelt azon háttérmechanizmusainak szakirodalmi feltárásai, amelyek révén kapcsolat mutatható ki a kardiovaszkuláris események vazotónust és aneurizmát meghatározó folyamatai között. Így a ClB és fenilurea vegyületek oxidatív stresszt kiváltó hatásainak mechanizmusát hozhattam összefüggésbe a vazokonstrikciót vagy aneurizmát kiváltó generális celluláris mechanizmusokkal.*
  - a, A ROS hatást kiváltó fenilurea és ClB vegyületek és metabolitjaik endokrin diszruptor vegyületek (EDC) tulajdonságúak, komplex módon hatnak a NO/eNOS rendszerre, amivel a vazokonstrikciót erősíthetik.*
  - b, A ROS mechanizmus közvetlen gyulladásos citokin expressziót fokozva destruálhatja az érendotélt, amivel a MMP működésen át gyengíti az érfastruktúrát aneurizmák kialakulásának kedvezve.*
  - c, A ROS hatáson keresztül fokozni képes a CRP mennyiségét, ami a vazokonstriktív válaszokat erősíti.*
  - d, A ROS mechanizmussal a vaszkuláris simaizomsejt miozin könnyű láncának  $Mg^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitását fokozva (az előzetes miozin könnyűlánc foszfatáz, RhoA/Rho kináz és DAG gátlásán át) erősítheti a heveny vazokonstrikció kialakulást.*
  - e, A ROS mechanizmussal aktivált apoptotikus folyamatok az aneurizma kialakulásában játszanak fontos szerepet.*
9. *A neuro-endokrin szabályozási csomópontok organizmus szintű ED hatás feltárása során megállapítottam, hogy a(z)*
  - a, AVP erős vazokonstrikciós tényező, amely a többutas intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szignalizáción keresztül fokozhatja ezt a hatását. Az OT vazoprotektív szerepű. Ezen két kardiovaszkulárisan ellentétes hatást képviselő hormon mennyiségét a vizsgált EDC-k szignifikánsan fokozzák. A hatásdominanciát mégis az AVP képviselte, amit a viselkedési vizsgálatok igazoltak.*

*b, a monoaminok (NA és 5-HT) által szabályozott AVP elválasztás zavara mellett ezek önálló kardiovaszkuláris szerepét is hangsúlyosan kell kezelni. Ugyanis a viselkedésmintázatok megváltoztatásával, a szorongás-fokozódás (humán vonatkozásban a mentális stressz növelésével) hozzájárulhat a vazospazmus, vagy aneurizmák kialakulásához.*

*c, ACTH lehetséges kardiovaszkuláris szerepét további vizsgálatokkal kell tisztáznunk.*

*d, PRL erős vazokonstriktor tulajdonságú az N-terminális fragmentjén keresztüli koszorúér relaxációt gátló hatása, valamint a NOS és  $\beta$ -adrenerg aktivációval kialakuló vazokonstriktív hatása révén.*

*e, az ösztrogének ösztrogén receptorokon (ER) keresztül a magban és a membránban fejtik ki hatásukat, amelyek kettős, vazodilatációs és/vagy vazokonstriktor jellegűek. A vaszkuláris simaizom membrán ER aktivációján keresztül a vazokonstriktor szerep erősödik.*

*Következményesen megállapítható, hogy az ED/nED hatótényező klórbenzol és uron vegyületek Kardiovaszkuláris Disruptor (KvD) támadáspontúak lehetnek, celluláris és organizmus szinten.*

*10. Az európai (ESC), amerikai (AHA) és japán (JCS) kardiovaszkuláris szakmai ajánlások az koszorúérspazmusok vonatkozásában a dohányzáson, drogokon és alkoholfogyasztáson kívül egyéb környezeti tényezők szerepét nem említik. Dolgozatomban rávilágítottam arra, hogy a 21. századra már megváltozott környezeti feltételek nagy valószínűséggel döntő szerepűek a bemutatott betegségek megjelenésében.*

*11. Az EDC kiváltotta hatások révén igazoltam azok kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában valószínűsíthető jelentőségét, ami megalapozza, hogy ezen ágensek potenciálisan Kardiovaszkuláris Disruptor Vegyületekként is értelmezhetők.*

A következtetésekből látható, hogy a kísérletes és klinikai eredményeim már kijelölték azokat a kutatási célterületeket, amelyekkel közvetlen hatótényező vizsgálattal tervezem igazolni a jelen dolgozatban feltárt kardiovaszkuláris jelentőséggel bíró csomópontokra gyakorolt dCIB, mCIB, PU, MU, DU hatásokat.



## 10 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni az SZTE Dr. Juhász Anna Környezettoxikológiai Kutató Műhely (Reg No: MU 69265069 0001; Assessment Report No: 28246596 003) munkatársainak, különösen Dr. Habil. Gálfi Márta és Dr. Sepp Krisztián témavezetőimnek az inspiráló közös munkákért és a folyamatos támogatásért.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Ungi Imre egyetemi docensnek, aki az orvos-szakmai munkámban nyújtott pótolhatatlan segítséget.

Köszönettel tartozom Családomnak, akik kutatási feladataim során mindenben támogattak a nyugodt családi háttér megteremtésével.

Köszönettel tartozom az **EFOP-3.4.3-16-2016-00014**, és az **EFOP-3.6.1-16-2016-00008** projekt támogatásukért!

## 11 Irodalomjegyzék

- 1;** M. Gochfeld, BD. Goldstein: Lessons in environmental health in the twentieth century. *Annu Rev Public Health*. 20: 35–53. (1999)
- 2;** N. Basu: Applications and implications of neurochemical biomarkers in environmental toxicology. *Environ Toxicol Chem*. 34: 22–29. (2015)
- 3;** C. Alias, L. Benassi, L. Bertazzi, S. Sorlini, M. Volta, U. Gelatti: Environmental exposure and health effects in a highly polluted area of Northern Italy: a narrative review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 26: 4555-4569. (2019)
- 4;** G. Pezzulo, M. Levin: Top-down models in biology: explanation and control of complex living systems above the molecular level. *J R Soc Interface*. 13: 20160555. (2016)
- 5;** DS. Goldstein: How does homeostasis happen? Integrative physiological, systems biological, and evolutionary perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 316(4): R301–R317. (2019)
- 6;** BF. Palmer, DJ. Clegg: Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. *Adv Physiol Educ*. 40: 480–490. (2016)
- 7;** E. Delpire, KB. Gagnon: Water Homeostasis and Cell Volume Maintenance and Regulation. *Curr Top Membr*. 81: 3–52. (2018)
- 8;** JA. Estrada, I. Contreras: Nutritional modulation of immune and central nervous system homeostasis: the role of diet in development of neuroinflammation and neurological disease. *Nutrients*. 11(5): 1076. (2019)
- 9;** PJ. Lee, GI. Papachristou: New insights into acute pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 16(8): 479-496. (2019)
- 10;** R. Hernaez, E. Solà, R. Moreau, P. Ginès: Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut*. 66: 541–553. (2017)
- 11;** SA. Hamed: Neurologic conditions and disorders of uremic syndrome of chronic kidney disease: presentations, causes, and treatment strategies, *Expert Rev Clin Pharmacol*. 12:1: 61-90. (2019)
- 12;** E. Zenaro, G. Piacentino, G. Constantin: The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 107: 41–56. (2017)
- 13;** K. França, TM. Lotti: Psycho-neuro-endocrine-immunology: a psychobiological concept. *Adv Exp Med Biol*. 99: 123-134. (2017)
- 14;** J. Mialet-Perez, C. Vindis: Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system. *Essays Biochem*. 61: 721–732. (2017)
- 15;** K. Breivika, R. Alcockb, Y. Lic, RE. Baileyd, H. Fiedlere, J.M. Pacyna. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environ Pollut*. 128: 3–16. (2004)
- 16;** RR. Black, CPM. Meyer, A. Touati, BK. Gullett, H. Fiedler, J.F. Mueller. Emission factors for PCDD/PCDF and dl-PCB from open burning of biomass. *Environ Int*. 38: 62–66. (2012)
- 17;** R. Poulsen, N. Cedergreen, T. Hayes, M. Hansen: Nitrate: an environmental endocrine disruptor? A review of evidence and research needs. *Environ Sci Technol*. 52: 3869–3887. (2018)
- 18;** MSZ EN ISO 14044:2006. Environmental management. Life cycle assessment. Requirements and guidelines.
- 19;** F. Arioli, F. Ceriani, M. Nobile, R. Vigano', M. Besozzi, S. Panzeri, LM. Chiesa: Presence of organic halogenated compounds, organophosphorus insecticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in meat of different game animal species from an Italian subalpine area, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 36(8): 1244-1252. (2019)
- 20;** M. Weselak, TE. Arbuckle, W. Foster: Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 10(1-2): 41-80. (2007)

- 21;** D. Zacs, I. Perkons, E. Pasecnaja, V. Bartkevics: Polychlorinated naphthalenes (PCNs) in food products in Latvia: Congener-specific analysis, occurrence, and dietary exposure of the general population. *Chemosphere*. 264: 128460. (2021).
- 22;** ATSDR Toxicological profile of hexachlorobenzene – update. Agency for toxic substances and disease registry, U-S. Public Health Service, Atlanta, GA. (1997)
- 23;** G. Wang, T. Jiang, S. Li, H. Hou, K. Xiao, J. Hu, S. Liang, B. Liu, J. Yang: Occurrence and exposure risk evaluation of polyhalogenated carbazoles (PHCZs) in drinking water. *Sci Total Environ*. 750: 141615. (2021)
- 24;** APW. Banks, X. Wang, M. Engelsman, C. He, AF. Osorio, JF. Mueller: Assessing decontamination and laundering processes for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and flame retardants from firefighting uniforms. *Environ Res*. 194: 110616. (2021)
- 25;** JZ. Buha-Markovi, AD. Marinkovi, SD. Nemoda, JZ. Savić: Distribution of PAHs in coal ashes from the thermal power plant and fluidized bed combustion system; estimation of environmental risk of ash disposal. *Environ Pollut*. 266: 115282. (2020)
- 26;** AU. Wickrama-Arachchige, T. Hirabayashi, Y. Imai, KS. Guruge, TS. Dharmaratne, T. Ohura: Accumulation of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons by different tuna species, determined by high-resolution gas chromatography Orbitrap mass spectrometry. *Environ Pollut*. 256: 113487. (2020)
- 27;** B. Świechowicz, B. Budziszewska, A. Starek: Hexachlorobenzene as a persistent organic pollutant: Toxicity and molecular mechanism of action. *Pharmacol Rep*. 69(6): 1232-1239. (2017)
- 28;** RE. Bailey: Global hexachlorobenzene emission. *Chemosphere*. 42: 167-182. (2001)
- 29;** JL. Barber, AJ. Sweetman, D. van Wijk, K. C. Jones: Hexachlorobenzene in the global environment: emissions, levels, distribution, trends and processes. *Sci Total Environ*. 349: 1-44. (2005)
- 30;** S. Hadjab, D. Maurel, Y. Cazals, P. Siaud, Hexachlorobenzene, a dioxin-like compound, disrupts auditory function in rat. *Hear Res*. 191: 125-134. (2004)
- 31;** A. Furka: Aromás szénhidrogének. In *Szerves Kémia* (Ed. Furka A.) pp. 249-274, Tankönyvkiadó Budapest, Budapest (1988)
- 32;** O. Brahmia, A. Boulkamh, T. Sehilli, J-P. Aguer, C. Richard: Kinetics of photocatalytic decomposition of fenuron over TiO<sub>2</sub> in aqueous solution. *Int J Photoenergy*. 4: 85–89. (2002)
- 33;** MA. Jayjock, CF. Chaisson, S. Arnold, EJ. Dederick: Modeling framework for human exposure assessment. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 17: S81–S89. (2007)
- 34;** A. Mokarizadeh, MR. Faryabi, MA. Rezvanfar, M. Abdollahi: A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol Mech Methods*. 25(4): 258-78. (2015)
- 35;** TT. Schuga, A. Janesickb, B. Blumbergb, JJ. Heindel: Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127: 204– 215. (2011)
- 36;** F. Maqbool, S. Mostafalou, H. Bahadar, M. Abdollahi: Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci*. 145: 265–273. (2016)
- 37;** M. Radács, M. Gálfi, A. Juhász, C. Varga, A. Molnár, F. László, FA. László: Histamine-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue cultures. *Regul Pept*. 134(2-3): 82-88. (2006)
- 38;** M. Gálfi, M. Radács, A. Juhász, F. László, A. Molnár, FA. László: Serotonin-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue culture. *Regul Pept*. 127(1-3): 225-231. (2005)

- 39;** Zs. Molnár, R. Pálföldi, A. László, M. Radács, K. Sepp, P. Hausinger, L. Tiszlavicz, Zs. Valkusz, M. Gálfi: Effects of chronic and subtoxic chlorobenzenes on adrenocorticotrophic hormone release, *J Environ Sci.* 34: 165-170. (2015)
- 40;** GBD 2017 Causes of Death Collaborators: Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 392: 1736–1788. (2018)
- 41;** GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators: Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 392:1859–1922. (2018)
- 42;** A. Vértes, E. Szabados: Cardiovascularis prevenció – 2016. *Orv Hetil.* 157(38): 1526–1531. (2016)
- 43;** M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough, M. Rayner: Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J.* 35: 2929. (2014)
- 44;** ESC Scientific Document Group: 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J.* 41(3): 407–477. (2020)
- 45;** American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines: ACC/AHA Guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. *Catheter Cardiovasc Interv.* 51(4): 505-521. (2000)
- 46;** M. Prinzmetal, R. Kennamer, R. Merliss, T. Wada, N. Bor: Angina pectoris. I. A variant form of angina pectoris; preliminary report. *Am J Med.* 27: 375-388. (1959)
- 47;** S. Saito, M. Yamagishi, T. Takayama, M. Chiku, J. Koyama, K. Ito, T. Higashikata, O. Seguci, J. Honye, K. Kanmatsuse: Plaque morphology at coronary sites with focal spasm in variant angina: study using intravascular ultrasound. *Circ J.* 67: 1041-1045. (2003)
- 48;** S. Stern, A. Bayes de Luna: Coronary artery spasm: a 2009 update. *Circulation.* 119:2531–4. (2009)
- 49;** F. Picard, N. Sayah, V. Spagnoli, J. Adjedj, O. Varenne: Vasospastic angina: A literature review of current evidence. *Arch Cardiovasc Dis.* 112(1): 44-55. (2019)
- 50;** AD. Callow: Cardiovascular disease 2005 - the global picture. *Vascul Pharmacol.* 45(5): 302–307. (2006)
- 51;** P. Ong, A. Athanasiadis, G. Borgulya, H. Mahrholdt, JC. Kaski, U. Sechtem: High prevalence of a pathological response to acetylcholine testing in patients with stable angina pectoris and unobstructed coronary arteries. The ACOVA study (Abnormal COronary VAsomotion inpatients with stable angina and unobstructed coronary arteries). *J Am Coll Cardiol.* 59(7): 655-662. (2012)
- 52;** JF. Beltrame, S. Sasayama, A. Maseri: Racial heterogeneity in coronary artery vasomotor reactivity: differences between Japanese and Caucasian patients. *J Am Coll Cardiol.* 33: 1442–1452. (1999)
- 53;** C. Pristipino, JF. Beltrame, M.L. Finocchiaro, R. Hattori, M. Fujita, R. Mongiardo, D. Cianflone, T. Sanna, S. Sasayama, A. Maseri: Major racial differences in coronary constrictor response between Japanese and Caucasians with recent myocardial infarction. *Circulation.* 101: 1102–1108. (2000)
- 54;** A. Montone, G. Niccoli, F. Fracassi, M. Russo, F. Gurgoglione, G. Cammà, G.A. Lanza, F. Crea: Patients with acute myocardial infarction and non-obstructive coronary arteries: safety and prognostic relevance of invasive coronary provocative tests. *Eur Heart J.* 39: 91-98. (2018)
- 55;** A. Da Costa, K. Isaz, E. Faure, S. Mourot, A. Cerisier, M. Lamaud: Clinical characteristics, aetiological factors and long-term prognosis of myocardial infarction with an absolutely normal coronary angiogram; a 3-year follow-up study of 91 patients. *Eur Heart J.* 22: 1459–1465. (2001)

- 56;** P. Ong, A. Athanasiadis, S. Hill, H. Vogelsberg, M. Voehringer, U. Sechtem: Coronary artery spasm as a frequent cause of acute coronary syndrome: the CASPAR (coronary artery spasm in patients with acute coronary syndrome) study. *J Am Coll Cardiol.* 52: 523–527. (2008)
- 57;** N. Nakayama, K. Kaikita, T. Fukunaga, Y. Matsuzawa, K. Sato, E. Horio, H. Yoshimura, M. Mizobe, S. Takashio, K. Tsujita, S. Kojima, S. Tayama, S. Hokimoto, T. Sakamoto, K. Nakao, S. Sugiyama, K. Kimura, H. Ogawa: Clinical features and prognosis of patients with coronary spasm-induced non-ST-segment elevation acute coronary syndrome *J Am Heart Assoc.* 3(3): e000795. (2014)
- 58;** DIL Shin, KB. Seung, S.M. Seo, PJ. Kim: The long-term cardiac mortality and the rate of percutaneous coronary intervention in Korean patients with vasospastic angina. *J Am Coll Cardiol.* 59: E1490. (2012)
- 59;** SW. Cho, TK. Park, HB. Gwag, AY. Lim, MS. Oh, DH. Lee, CS. Seong, JH. Yang, YB. Song, JY. H, JH. Choi, SH. Lee, HC. Gwon, SH. Choi: Clinical outcomes of vasospastic angina patients presenting with acute coronary syndrome. *J Am Heart Assoc.* (11)5: e004336. (2016)
- 60;** JCS Joint Working Group: Guidelines for diagnosis and treatment of patients with vasospastic angina (coronary spastic angina) (JCS 2013). *Circ J.* 78: 2779–2801. (2014)
- 61;** E. Pikkarainen, J. Blomster, J. Sipilä, P. Rautava, V. Kytö: Occurrence and mortality of vasospastic angina pectoris hospitalised patients in Finland: a population-based registry cohort study. *BMJ Open.* 9(11): e030768. (2019)
- 62;** S. Juvela, M. Hillbom, H. Numminen, P. Koskinen. Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 24: 639-646. (1993)
- 63;** H. Kang, P. Tangming, Q. Zenghui, L. Youxiang, J. Chuhan, J. Wenjun, W. Jing, X. Wenjuan, W. Xiaolong, L. Aihua: Impact of hypertension and smoking on the rupture of intracranial aneurysms and their joint effect. *Neurol Neurochir Pol.* 49: 121-125. (2015)
- 64;** V. Phama, Q. de Hemptinne, J-M. Grindac, D. Duboc, O. Varennea, F. Picard: Giant coronary aneurysms, from diagnosis to treatment: A literature review. *Arch Cardiovasc Dis.* 113(1): 59-69. (2020)
- 65;** JA. Elefteriades, BA. Ziganshin: Paradigm for Detecting Silent Thoracic Aneurysm Disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 28(4): 776-782. (2016)
- 66;** GA. Kuzmik, AX. Sang, JA. Elefteriades: Natural history of thoracic aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 56: 565-71. (2012)
- 67;** M. Weinreich, P-J. Yu, B. Trost: Sinus of valsalva aneurysms: review of the literature and an update on management. *Clin Cardiol.* 38(3): 185-189. (2015)
- 68;** AO. Bricker, B. Avutu, T-LH. Mohammed, EE. Williamson, IS. Syed, PR. Julsrud, P. Schoenhagen, J. Kirsch: Valsalva Sinus Aneurysms: Findings at CT and MR Imaging. *Radiographics.* 30(1): 99-110. (2010)
- 69;** DA. Ott: Aneurysm of the sinus of Valsalva. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 165-176. (2006)
- 70;** S. Sarıkaya, T. Adademir, A. Elibol, F. Büyükbayrak, A. Onk, K. Kıralli: Surgery for ruptured sinus of Valsalva aneurysm: 25-year experience with 55 patients. *Eur J CardioThorac Surg.* 43: 591–596. (2013)
- 71;** TJ. Takach, GJ. Reul, J.M Duncan, DA. Cooley, JJ. Livesay, DA. Ott, O.H. Frazier: Sinus of Valsalva Aneurysm or Fistula: Management and Outcome. *Ann Thorac Surg.* 68(5): 1573-1577. (1999)
- 72;** EK. Cosselman, A. Navas-Acien, JD. Kaufman: Environmental factors in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 12(11): 627-642. (2015)

- 73;** Z. Valkusz, G. Nagyéri, M. Radács, T. Ocskó, P. Hausinger, M. László, FA. László, A. Juhász, J. Julesz, M. Gálfi: Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes. *Physiol Behav.* 103(5): 421-430. (2011)
- 74;** A. Baranyai, L. Erdélyi, O. Fehér, J. Nemcsók: A szerotoninerg neuronok. In *Molekuláris fiziológia*. pp. 130-132. JATE, Szeged (1990)
- 75;** HS. Jorgensen: Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull.* 54: 266-288. (2007)
- 76;** PM. Vanhoutte: Serotonin and the vascular wall. *Int J Cardiol.* 14: 189-203. (1987)
- 77;** WH. Frishman, P. Grewall: Serotonin and the heart. *Ann Med.* 32: 195-209. (2000)
- 78;** JM. Van Nueten, WJ. Janssens, PM. Vanhoutte: Serotonin and vascular smooth muscle. In: Vanhoutte PM. ed. *Serotonin and the cardiovascular system*. New York: Raven Press. 95-103. (1985)
- 79;** H. Jorgensen, A. Kjaer, U. Knigge, M. Moller, J. Warberg: Serotonin stimulates hypothalamic mRNA expression and local release of neurohypophysial peptides. *J Neuroendocrinol.* 15: 564-571. (2003)
- 80;** CM. Vacher, P. Fretier, C. Creminon, A. Calas, H. Hardin-Pouzet: Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci.* 22: 1513-1522. (2002)
- 81;** M. Birnbaumer: Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 11: 406-410. (2000)
- 82;** RM. de Almeida, PF. Ferrari, S. Parmigiani, KA. Miczek: Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. *Eur J Pharmacol.* 526: 51-64. (2005)
- 83;** G. Nagyéri, Z. Valkusz, M. Radács, T. Ocskó, P. Hausinger, M. László, FA. László, A. Juhász, J. Julesz, M. Gálfi: Behavioral and endocrine effects of chronic exposure to low doses of chlorobenzenes in Wistar rats. *Neurotoxicol Teratol.* 34(1): 9-19. (2012)
- 84;** J. Szentágothai, M. Réthelyi: A környéki idegrendszer. In *Funkcionális anatómia III. Medicina, Budapest*, pp. 1609-1670. (2002)
- 85;** S. Guimarães, D. Moura: Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacol Rev.* 53: 319-356. (2001)
- 86;** L. Brawley, AM. Shaw, A. MacDonald: Role of endothelium/nitric oxide in atypical  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol.* 398: 285-296. (2000)
- 87;** JA. Angus, TM. Cocks, K. Satoh: The  $\alpha$ -adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc* 45: 2355-2359. (1986)
- 88;** J. Motiejunaite, L. Amar, E. Vidal-Petiot: Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol (Paris).* 82:193-197. (2021)
- 89;** MR. Bristow, RE. Hershberger, JD. Port, EM. Gilbert, A. Sandoval, R. Rasmussen, AE. Cates, AM. Feldman: Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation.* 82: I12-25. (1990)
- 90;** IN. Santos, RC. Spadari-Bratfisch: Stress and cardiac beta adrenoceptors. *Stress.* 9(2): 69-84. (2006)
- 91;** CL. Holmes, DW. Landry, JT. Granton: Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1-receptor physiology. *Crit Care.* 7: 427-434. (2003)
- 92;** M. Morris, N. Alexander: Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. *Hypertension.* 13: 110-114. (1989)
- 93;** S. Jard: Mechanisms of action of vasopressin and vasopressin antagonists. *Kidney Int Suppl.* 26: S38-42. (1988)
- 94;** H. Hupf, D. Grimm, GA. Riegger, H. Schunkert: Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ Res.* 84: 365-370. (1999)

- 95;** JS. Pelletier, B. Dicken, D. Bigam, P-Y. Cheung: Cardiac effects of vasopressin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 64(1): 100-107. (2014)
- 96;** CL. Holmes, DW. Landry, JT. Granton: Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care.* 8(1): 15-23. (2004)
- 97;** M. Thibonnier, DM. Conarty, JA. Preston, CL. Plesnicher, RA. Dweik, SC. Erzurum: Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology.* 140: 1301-1309. (1999)
- 98;** WA. Boyle 3rd, LD. Segel: Attenuation of vasopressin-mediated coronary constriction and myocardial depression in the hypoxic heart. *Circ Res.* 66: 710-721. (1990)
- 99;** TG. Kampmeier, S. Rehberg, M. Westphal, M. Lange: Vasopressin in sepsis and septic shock. *Minerva Anesthesiol.* 76: 844-850. (2010)
- 100;** IF. Bielsky, SB. Hu, KL. Szegda, H. Westphal, LJ. Young: Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* 29: 483-493. (2004)
- 101;** A. Wigger, MM. Sanchez, KC. Mathys, K. Ebner, E. Frank, D. Liu, A. Kresse, ID. Neumann, F. Holsboer, PM. Plotsky, R. Landgraf: Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology.* 29: 1-14. (2004)
- 102;** N. Egashira, K. Mishima, K. Iwasaki, R. Oishi, M. Fujiwara: New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions. *J Pharmacol Sci.* 109: 44-49. (2009)
- 103;** EF. Coccaro, RJ. Kavoussi, RL. Hauger, TB. Cooper, CF. Ferris: Cerebrospinal fluid vasopressin levels: correlates with aggression and serotonin function in personality-disordered subjects. *Arch Gen Psychiatry.* 55: 708-714. (1998)
- 104;** KL. Gobrogge, Y. Liu, X. Jia, Z. Wang: Anterior hypothalamic neural activation and neurochemical associations with aggression in pair-bonded male prairie voles. *J Comp Neurol.* 502: 1109-1122. (2007)
- 105;** SR. Wersinger, HK. Caldwell, M. Christiansen, WS. Young, III: Disruption of the vasopressin 1b receptor gene impairs the attack component of aggressive behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 6: 653-660. (2007)
- 106;** A. Rozanski, JA. Blumenthal, J. Kaplan: Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 99: 2192-2217. (1999)
- 107;** RC. Yeith, L. Lewis, OA. Linares, MA. Raskin, EC. Villacres, MM. Murburg, EA. Ashleigh, S. Castillo, ER. Peskind, M. Pascualy, JB. Halter. Sympathetic nervous system in major depression: basal and desipramine-induced alterations in plasma norepinephrine kinetics. *Arch Gen Psychiatry.* 51: 411-422. (1994)
- 108;** PW. Gold, DL. Loriaux, A. Roy, MA. Kling, JR. Calabrese, CH. Kellener, LK. Nieman, RM. Post, D. Pickar, W. Gallucci, P. Avgerinos, S. Paul, EH. Oldfield, JB. Cutler Jr, GP. Chrousos: Response to corticotropin releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. *N Engl J Med.* 314: 1329-1335. (1986)
- 109;** JR. Kaplan, SS. Manuck, TB. Clarkson, FM. Lusso, DM. Taub, EW. Miller: Social stress and atherosclerosis in normocholesterolemic monkeys. *Science.* 220: 733-735. (1983)
- 110;** HB. Skantze, J. Kaplan, K. Pettersson, S. Manuck, N. Blomqvist, R. Kyes, K. Williams, G. Bondjers: Psychosocial stress causes endothelial injury in cynomolgus monkeys via B<sub>1</sub>-adrenoceptor activation. *Atherosclerosis.* 136:153-161. (1998)
- 111;** DL. Musselman, A. Tomer, AK. Manatunga, BT. Knight, MR. Porter, S. Kasey, U. Marzec, LA. Harker, CB. Nemeroff: Exaggerated platelet reactivity in major depression. *Am J Psychiatry.* 153(10): 1313-1317. (1996)



- 112;** MY. Hung, CT. Mao, MJ. Hung, JK. Wang, HC. Lee, CT. Yeh, P. Hu, TH. Chen, NC Chang: Coronary artery spasm as related to anxiety and depression: a nationwide population-based study. *Psychosom Med.* 81: 237–245. (2019)
- 113;** LÅ Nyrønning, M. Stenman, R. Hultgren, G. Albrektsen, V. Videm, E. Mattsson: Symptoms of depression and risk of abdominal aortic aneurysm: A HUNT Study. *J Am Heart Assoc.* 8(21): e012535. (2019)
- 114;** M. Daskalopoulou, J. George, K. Walters, DP. Osborn, GD. Batty, D. Stogiannis, E. Rapsomaniki, M. Pujades-Rodriguez, S. Denaxas, R. Udumyan, M. Kivimaki, H. Hemingway: Depression as a risk factor for the initial presentation of twelve cardiac, cerebrovascular, and peripheral arterial diseases: data linkage study of 1.9 million women and men. *PLoS One.* 11(4): e0153838. (2016)
- 115;** AS. McNeilly, IC. Robinson, MJ. Houston, PW. Howie: Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. *Br Med J (Clin Res Ed).* 286: 257-259. (1983)
- 116;** Y. Mizumoto, K. Furuya, N. Makimura, C. Mitsui, K. Seki, T. Kimura, I. Nagata: Gene expressions of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary. *Horm Res.* 44(Suppl 2): 47-49. (1995)
- 117;** W. Huang, SL. Lee, SS. Arnason, M. Sjöquist: Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. *Am J Physiol.* 270: R427-R433. (1996)
- 118;** UM. Moll, BL. Lane, F. Robert, V. Geenen, JJ. Legros: The neuroendocrine thymus. Abundant occurrence of oxytocin-, vasopressin-, and neurophysin-like peptides in epithelial cells. *Histochemistry.* 89: 385-390. (1988)
- 119;** J. Hawthorn, SS. Nussey, JR. Henderson, JS. Jenkins: Immunohistochemical localization of oxytocin and vasopressin in the adrenal glands of rat, cow, hamster and guinea pig. *Cell Tissue Res.* 250: 1-6. (1987)
- 120;** T. Kimura, O. Tanizawa, K. Mori, M. J. Brownstein, H. Okayama, Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature.* 356: 526-529. (1992).
- 121;** DA. Brown, TS. Sihra: Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol.* 184: 207-260. (2008)
- 122;** DE Olazábal: Role of oxytocin in parental behaviour. *J Neuroendocrinol.* 30(7): e12594. (2018)
- 123;** AK. Ragnauth, N. Devidze, V. Moy, K. Finley, A. Goodwillie, LM. Kow, LJ. Muglia, DW. Pfaff: Female oxytocin gene-knockout mice, in a semi-natural environment, display exaggerated aggressive behavior. *Genes Brain Behav.* 4: 229-239. (2005)
- 124;** JA. Amico, RC. Mantella, RR. Vollmer, X. Li: Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *J Neuroendocrinol.* 16: 319-324. (2004)
- 125;** D. Neumann: Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol.* 20: 858-865. (2008)
- 126;** M. Waldherr, ID. Neumann: Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 16681-16684. (2007)
- 127;** P. Kirsch, C. Esslinger, Q. Chen, D. Mier, S. Lis, S. Siddhanti, H. Gruppe, VS. Mattay, B. Gallhofer, A. Meyer-Lindenberg: Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J Neurosci.* 25: 11489-11493. (2005)
- 128;** M. Petersson: Cardiovascular effects of oxytocin. Chapter 22, *Prog Brain Res.* 139: 281-288. (2002)
- 129;** H. Yazawa, A. Hirasawa, K. Horie, Y. Saita, E. Iida, K. Honda, G. Tsujimoto: Oxytocin receptors expressed and coupled to Ca<sup>2+</sup> signalling in a human vascular smooth muscle cell line. *Br J Pharmacol.* 117(5): 799-804. (1996)

- 130;** BM. Altura, BT. Altura: Actions of vasopressin, oxytocin, and synthetic analogs on vascular smooth muscle. *Fed Proc.* 43: 80- 86. (1984)
- 131;** M. Jankowski, TL. Broderick, J. Gutkowska: Oxytocin and cardioprotection in diabetes and obesity. *BMC Endocr Disord.* 16(1): 34. (2016)
- 132;** F. Hernando, O. Schoots, SJ. Lolait, JP. Burbach: Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology.* 142: 1659-1668. (2001)
- 133;** M. Galfi, WKA. Khalil, Z. Valkusz, L. Gaspar, A. Juhasz, J. Julesz, J. Molnar: Functional membrane changes due to tumor induction in rat pituitary cell cultures. *J Exp Clin Cancer Res.* 19: 531-535. (2000)
- 134;** E. Harno, T. Gali Ramamoorthy, AP. Coll, A. White: POMC: the physiological power of hormone processing. *Physiol Rev.* 98: 2381–2430. (2018)
- 135;** V. Chhajlani: Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int.* 38(1): 73-80. (1996)
- 136;** T. Brzoska, TA. Luger, C. Maaser, C. Abels, M. Böhm: Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endoc Rev.* 29(5): 581–602. (2008)
- 137;** U. Nordheim, JR. Nicholson, K. Dokladny, P. Dunant, KG. Hofbauer: Cardiovascular responses to melanocortin 4-receptor stimulation in conscious unrestrained normotensive rats. *Peptides.* 27(2): 438-443. (2006)
- 138;** JE. Goodwin, J. Zhang, DS. Geller: A critical role for vascular smooth muscle in acute glucocorticoid-induced hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 19(7): 1291-1299. (2008)
- 139;** C. Gonzalez, AM. Corbacho, JP. Eiserich, C. Garcia, F. Lopez-Barrera, V. Morales-Tlalpan, AB. Espinosa, M. Diaz-Munoz, R. Rubio, S-H. Lin, G. Martinez de la Escalera, C. Clapp: 16K-Prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology.* 145: 5714-5722. (2004)
- 140;** C. Molinari, E. Grossini, DASG. Mary, F. Uberti, E. Ghigo, F. Ribichini, N. Surico, G. Vacca: Prolactin induces regional vasoconstriction through the  $\beta$ 2-adrenergic and nitric oxide mechanisms. *Endocrinology* 148(8): 4080-4090. (2007)
- 141;** C. Gonzalez, H. Rosas-Hernandez, B. Jurado-Manzano, MA. Ramirez-Lee, S. Salazar-Garcia, PP. Martinez-Cuevas, AJ. Velarde-Salcedo, H. Morales-Loredo, R. Espinosa-Tanguma, SF. Ali, R. Rubio: The prolactin family hormones regulate vascular tone through NO and prostacyclin production in isolated rat aortic rings. *Acta Pharmacol Sin.* 36: 572–586. (2015)
- 142;** ME. Freeman, B. Kanyicska, A. Lerant, G. Nagy: Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80(4): 1523-1631. (2000)
- 143;** M. Shekarabi, J. Zhang, AR. Khanna, DH. Ellison, E. Delphire, KT. Kahle: WNK Kinase Signaling in Ion Homeostasis and Human Disease. *Cell Metab.* 25(2): 285-299. (2017)
- 144;** Z. Molnár, R. Pálföldi, A. László, M. Radács, M. László, P. Hausinger, L. Tiszlavicz, Z. Rázga, Z. Valkusz, M. Gálfí: The effects of hypokalaemia on the hormone exocytosis in adenohypophysis and prolactinoma cell culture model systems. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 122(10): 575-581. (2014)
- 145;** A. Velez, JS. McKinney: Reversible cerebral vasoconstriction syndrome: a review of recent research. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13: 319 (2013)
- 146;** CG. Sobey: Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 28-38. (2001)

- 147;** M. Félétou: Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmac.* 156: 545–556. (2009)
- 148;** MC. Teruhiko: Potassium in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 6(1): 31-35. (2004)
- 149;** T. Murata, T. Horiuchi, T. Goto, Y. Li, K. Hong: Vasomotor response induced by change of extracellular potassium and magnesium in cerebral penetrating arterioles. *Neurosci Res.* 70: 30-34. (2011)
- 150;** HJ. Knot, PA. Zimmermann, MT. Nelson: Extracellular K<sup>+</sup>-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 492: 419-430. (1996)
- 151;** H. Miura, K. Toyama, PF. Pratt, DD. Gutterman: Cigarette smoking impairs Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the human coronary microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300(1): H109–H117. (2011)
- 152;** D. Grassi, G. Desideri, L. Ferri, A. Aggio, S. Tiberti, C. Ferri: Oxidative stress and endothelial dysfunction: say no to cigarette smoking! *Curr Pharm Des.* 16: 2539-2550. (2010)
- 153;** RMJ. Palmer, DS. Ashton, S. Moncada: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333: 664-666. (1988)
- 154;** WZ. Zhang, K. Venardos, J. Chin-Dusting, DM. Kaye: Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension.* 48(2): 278-285. (2006)
- 155;** S. Milstien, Z. Katusic: Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 263: 681–684. (1999)
- 156;** U. Förstermann: Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 459: 923–939. (2010)
- 157;** J. Strobel, M. Mieth, B. Endress, D. Auge, J. König, MF. Fromm, R. Maas: Interaction of the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine (ADMA) with the human cationic amino acid transporter 1 (CAT1). *J Mol Cell Cardiol.* 53(3): 392-400. (2012)
- 158;** S. Verma, TJ. Anderson: Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* 105: 546–549. (2002)
- 159;** P. Libby: Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420: 868–874. (2002)
- 160;** MB. Pepys, GM. Hirschfield: C-reactive protein: A critical update. *J Clin Invest.* 111: 1805–1812. (2003)
- 161;** S. Verma, CH. Wang SH. Li, AS. Dumont, PWM. Fedak, MV. Badiwala, B. Dhillon, RD. Weisel, RK Li, DAG. Mickle: A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 106: 913–919. (2002)
- 162;** P. Stenvinkel: Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link? *Nephrol Dial Transplant.* 16: 1968–1971. (2001)
- 163;** T. Itoh, Y. Mizuno, E. Harada, M. Yoshimura, H. Ogawa, H. Yasue: Coronary spasm is associated with chronic low-grade inflammation. *Circ J.* 71: 1074–1078. (2007)
- 164;** H. Suzuki, S. Kawai, T. Aizawa, K. Kato, S. Sunayama, R. Okada, H. Yamaguchi: Histological evaluation of coronary plaque in patients with variant angina: Relationship between vasospasm and neointimal hyperplasia in primary coronary lesions. *J Am Coll Cardiol.* 33: 198–205. (1999)
- 165;** MJ. Hung, WJ. Cherng, NI. Yang, CW. Cheng, LF. Li: Relation of high sensitivity C-reactive protein level with coronary vasospastic angina pectoris in patients without hemodynamically significant coronary artery disease. *Am J Cardiol* 96: 1484–1490. (2005)
- 166;** H. Ogawa, T. Sakamoto, K. Nishiyama, H. Soejima, K. Kaikita, K. Takazoe, S. Miyamoto, K. Kugiyama, M. Yoshimura, H. Yasue: Elevated levels of soluble intercellular adhesion

molecule-1 in the coronary circulation of patients with coronary organic stenosis and spasm. *Jpn Circ J.* 64: 170–176. (2000)

**167;** M. Nakayama, M. Yoshimura, T. Sakamoto, Y. Shimasaki, S. Nakamura, T. Ito, K. Abe, M. Yamamuro, Y. Miyamoto, Y. Saito, K. Nakao, H. Yasue, H. Ogawa: Synergistic interaction of T-786-->C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking for an enhanced risk for coronary spasm. *Pharmacogenetics.* 13: 683–688. (2003)

**168;** M. Jougasaki, H. Yasue, K. Takahashi. Perivascular nerve lesion of the coronary artery involved in spasm in a patient with variant angina. *Pathology.* 21: 304–307. (1989)

**169;** H. Shimokawa: 2014 Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities-from bench to bedside. *Eur Heart J.* 35: 3180–3193. (2014)

**170;** I. Hunter, HJ. Cobban, P. Vandenabeele, DJ. MacEwan, GF. Nixon: Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: Role in the  $Ca^{2+}$  sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 63: 714–721. (2003)

**171;** H. Shimokawa: Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm: lessons from animal models. *Jpn Circ J.* 64: 1–12. (2000)

**172;** B. Staarmann, M. Smith, CJ. Prestigiacomo: Shear stress and aneurysms: a review. *Neurosurg Focus.* 47(1): E2. (2019)

**173;** RA. Quintana, WR. Taylor: Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation. *Circ Res.* 124(4): 607–618. (2019)

**174;** HW. Kim, AL. Blomkalns, M. Ogbi, M. Thomas, D. Gavrilu, BS. Neltner, LA. Cassis, RW. Thompson, RM. Weiss, PD. Lindower, VM. Blanco, ML. McCormick, A. Daugherty, X. Fu, SL. Hazen, BK. Stansfield, Y. Huo, DJ. Fulton, T. Chatterjee, NL. Weintraub: Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 313: H1168–H1179. (2017)

**175;** JA. Ambrose, RS. Barua: The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease an update. *J Am Coll Cardiol.* 43(10): 1731–1737. (2004)

**176;** AS. Allerman Faarvang, SA Rørdam Preil, P. Switten Nielsen, HC. Beck, LP. Kristensen, LM. Rasmussen: Smoking is associated with lower amounts of arterial type I collagen and decorin. *Atherosclerosis.* 247: 201–206. (2016)

**177;** S. Wang, C. Zhang, M. Zhang, B. Liang, H. Zhu, J. Lee, B. Viollet, L. Xia, Y. Zhang, MH. Zou: Activation of AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat Med.* 18(6): 902–910. (2012)

**178;** A. Sampilvanjil, T. Karasawa, N. Yamada, T. Komada, T. Higashi, C. Baatarjav, S. Watanabe, R. Kamata, N. Ohno, M. Takahashi: Cigarette smoke extract induces ferroptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 318: H508–H518. (2020)

**179;** J. Li, F. Cao, HL. Yin, ZJ. Huang, ZT. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang: Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* 11(2): 88 (2020)

**180;** R. Tulamo, J. Frösen, J. Hernesniemi, M. Niemelä: Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. *J Neurointerv Surg.* 10(Suppl 1): i58–i67. (2018)

**181;** SW. Rabkin: Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. *Vasa.* 43: 433–442. (2014)

**182;** JB. Knox, GK. Sukhova, AD. Whittemore, P. Libby: Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 95: 205–212. (1997)

**183;** IO. Peshkova, G. Schaefer, EK. Koltsova: Atherosclerosis and aortic aneurysm – is inflammation a common denominator? *FEBS J.* 283(9): 1636–1652. (2016)

- 184;** G. Albaugh, E. Bellavance, L. Strande, S. Heinburger, CW. Hewitt, JB. Alexander: Nicotine induces mononuclear leukocyte adhesion and expression of adhesion molecules, VCAM and ICAM, in endothelial cells in vitro. *Ann Vasc Surg.* 18: 302–307. (2004)
- 185;** PP. Lau, L. Li, AJ. Merched, AL. Zhang, KW. Ko, L. Chan: Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor (-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 143–149. (2006)
- 186;** World Health Organization; Environmental Health Criteria 240, Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. ISBN 978 92 4 157240 8 (2009)
- 187;** J. Falandysz, K. Szymczyk, M. Gucia: Intake of hexachlorobenzene with food in Poland. *Polish J Environ Stud.* 10(3): 155-160. (2001)
- 188;** EJ. Mrema, FM. Rubino, G. Brambilla, A. Moretto, AM. Tsatsakis, C. Colosio: Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology.* 307: 74– 88. (2013)
- 189;** A. Witczak, A. Pohoryło, H. Abdel-Gawad: Endocrine-disrupting organochlorine pesticides in human breast milk: changes during lactation. *Nutrients.* 13: 229. (2021)
- 190;** L. Reed, V. Büchner, PB. Tchounwou: Environmental toxicology and health effects associated with hexachlorobenzene exposure. *Rev Environ Health.* 22(3): 213-243. (2007)
- 191;** H. Lilienthal, C. Bente, B. Heinzow, G. Winneke: Impairment of schedule-controlled behavior by pre- and postnatal exposure to hexachlorobenzene in rats. *Arch Toxicol.* 70: 174-181. (1996)
- 192;** N. Ribas-Fitó, M. Torrent, D. Carrizo, J. Júlvez, JO. Grimalt, J. Sunyer: Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy and children's social behavior at 4 years of age. *Environ Health Perspect.* 115(3): 447-450. (2007)
- 193;** F. Chiappinia, M. Sancheza, N. Mireta, C. Coccab, E. Zottac, L. Ceballosa, C. Pontilloa, M. Bilotasd, A. Randia: Exposure to environmental concentrations of hexachlorobenzene induces alterations associated with endometriosis progression in a rat model. *Food Chem Toxicol.* 123: 151–161. (2019)
- 194;** BJ. Versonnen, K. Arijs, T. Verslycke, W. Lema, CR. Janssen: In vitro and in vivo estrogenicity and toxicity of o-, m-, and p-dichlorobenzene. *Environ Toxicol Chem.* 22(2): 329-335. (2003)
- 195;** K. Sepp, AM. Laszlo, Z. Molnar, A. Serester, T. Alapi, M. Galfi, Z. Valkusz, M. Radacs: The role of uron and chlorobenzene derivatives, as potential endocrine disrupting compounds, in the secretion of ACTH and PRL. *Int J Endocrinol.* 2018: 7493418. (2018)
- 196;** M. Fardouna, H. Dehainib, A. Shaitoc, J. Mesmara, A. El-Yazbib, A. Badrane, E. Beydouna, AH. Eid: The hypertensive potential of estrogen: An untold story. *Vascul Pharmacol.* 124: 106600. (2020)
- 197;** J. Michałowicz, K. Mokra, K. Rosiak, P. Sicińska, B. Bukowska: Chlorobenzenes, lindane and dieldrin induce apoptotic alterations in human peripheral blood lymphocytes (in vitro study). *Environ Toxicol Pharmacol.* 36: 979–988. (2013)
- 198;** J. Fu, Q. Shi, X. Song, X. Xia, C. Su, Z. Liu, E. Song, Y. Song: Tetrachlorobenzoquinone exhibits neurotoxicity by inducing inflammatory responses through ROS-mediated IKK/IκB/NF-κB signaling. *Environ Toxicol Pharmacol.* 41: 241–250. (2016)
- 199;** Z. Liu, X. Lv, B. Yang, Q. Qin, E. Song, Y. Song: Tetrachlorobenzoquinone exposure triggers ferroptosis contributing to its neurotoxicity. *Chemosphere.* 264(Pt 1): 128413. (2021)200;
- BE. Watt, AT. Proudfoot, SM. Bradberry, JA. Vale: Poisoning due to urea herbicides. *Toxicol Rev.* 24(3): 161-166. (2005)
- 201;** AM. Mohammed, M. Huovinen, KH. Vähäkangas: Toxicity of diuron metabolites in human cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 78: 103409. (2020)

- 202;** M. Kwiatkowska, H. Nowacka-Krukowskab, B. Bukowska: The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 37: 1101–1108. (2014)
- 203;** B. Zhao, DS. Baston, B. Hammock, MS. Denison: Interaction of diuron and related substituted phenylureas with the Ah receptor pathway. *J Biochem Mol Toxicol.* 20(3): 103-113. (2006)
- 204;** R. Santosa, C. Piccolib, C. Cremonesea, C. Freire: Thyroid and reproductive hormones in relation to pesticide use in an agricultural population in Southern Brazil. *Environ Res.* 173: 221–231. (2019)
- 205;** R. Tasmin, Y. Shimasaki, M. Tsuyama, X. Qiu, F. Khalil, N. Okino, N. Yamada, S. Fukuda, IJ. Kang, Y. Oshima: Elevated water temperature reduces the acute toxicity of the widely used herbicide diuron to a green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21(2): 1064-1070. (2014)
- 206;** D. Behrens, J. Rouxel, T. Burgeot, F. Akcha: Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: Implication of reactive oxygen species production. *Aquat Toxicol.* 175: 249-259. (2016)
- 207;** AA. Felício, JS. Freitas, J. Bolpeti Scarin, L. de Souza Ondeí, FB. Teresa, D. Schlenk, E. Alves de Almeida: Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 149: 248-256. (2018)
- 208;** M. Huovinen, J. Loikkanen, J. Naarala, K. Vähäkangas: Toxicity of diuron in human cancer cells. *Toxicol in Vitro.* 29(7): 1577-1586. (2015)
- 209;** AC. Gardini, G. Marisi, L. Faloppi, E. Scarpi, FG. Foschi, M. Iavarone, G. Lauletta, J. Corbelli, M. Valgiusti, F. Facchetti, CD. Corte, LM. Neri, S. Tamberi, S. Cascinu, M. Scartozzi, D. Amadori, O. Nanni, E. Tenti, P. Ulivi, GL. Frassinetti: eNOS polymorphisms and clinical outcome in advanced HCC patients receiving sorafenib: final results of the ePHAS study. *Oncotarget.* 7(19): 27988-27999. (2016)
- 210;** L. Morbidelli, S. Donnini, M. Ziche: Targeting endothelial cell metabolism for cardio-protection from the toxicity of antitumor agents. *Cardiooncology.* 2(1): 3. (2016)
- 211;** Y. Arima, S. Oshima, K. Noda, H. Fukushima, I. Taniguchi, S. Nakamura, M. Shono, H. Ogawa: Sorafenib-induced acute myocardial infarction due to coronary artery spasm. *J Cardiol.* 54(3): 512-515. (2009)
- 212;** DH. Lim, JH. Yoon, DW. Jun, OY. Lee, BC. Yoon, HR. Lee, KS. Kim, HS. Choi: Recurrent coronary artery vasospasm in a patient with hepatocellular carcinoma treated with Sorafenib: a case report and literature review. *J Liver Cancer.* 20(1): 67-71. (2020)
- 213;** JM. Koolhaas, CM. Coppens, SF. de Boer, B. Buwalda, P. Meerlo, P.J. Timmermans: The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *J Vis Exp.* 77: e4367. (2013)
- 214;** AK. Kraeuter, PC. Guest, Z. Sarnyai: The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. paul c. guest (ed.), pre-clinical models: techniques and protocols. *Methods Mol Biol.* 1916: 99-103. (2019)
- 215;** PM. Wall, C. Messier: Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Behav Brain Res.* 114: 199–212. (2000)
- 216;** EP. Kokhdan, K. Ahmadi, H. Sadeghi, H. Sadeghi, F. Dadgary, N. Danaei, MR. Aghamaali: Hepatoprotective effect of *Stachys pilifera* ethanol extract in carbon tetrachloride-induce hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol.* 55: 1389–1393. (2017)

- 217;** AH. Tezcan, O. Ozturk, S. Ustebay, Y. Adali, H. Yagmurdur: The beneficial effects of ozone therapy in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacol Rep.* 70(2): 340–345. (2018)
- 218;** MJ. Selinger, DS. Matloff, MM. Kaplan:  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: serum elevation is independent of hepatic GGTP activity. *Clin Chim Acta.* 125: 283-290. (1982)
- 219;** LP. Noldus, AJ. Spink, RA. Tegelenbosch: EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 33(3): 398-414. (2001)
- 220;** M. Lkhider, S. Delpal, MO. Bousquet: Rat prolactin in serum, milk, and mammary tissue: characterization and intracellular localization. *Endocrinology.* 137(11): 4969-4979. (1996)
- 221;** F. Laczi, T. Iványi, J. Julesz, T. Janáky, FA. László: Plasma arginine-8-vasopressin responses to osmotic or histamine stimulation contribute to the differential diagnosis of central diabetes insipidus. *Acta Endocrinol (Copenh).* 113: 168-174. (1986)
- 222;** J. Dogterom, TB. van Wimersma Greidanus, D. De Wied: Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog, and rat. *Am Physiol.* 234(5): E463-E467. (1978)
- 223;** M. Vecsernyés, A. Török, I. Jójárt, F. Laczi, B. Penke, J. Julesz J: Specific radioimmunoassay of oxytocin in rat plasma. *Endocr Reg.* 28(3): 145-150. (1994)
- 224;** OH. Lowry, NJ. Rosebrough, AL. Farr, RJ. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75. (1951)225; MI. Rodríguez Piñeiro, G. Bencheikroun, P. de Fornel-Thibaud, C. Maurey-Guenec, F. Garnier, D. Rosenberg: Accuracy of an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) immunoluminometric assay for differentiating ACTH-dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in Dogs. *J Vet Intern Med.* 23: 850–855. (2009)
- 226;** M. Guclu, S. Cander, S. Kiyici, E. Vatansever, A. Bayram Hacıhasanoğlu, G. Kısakol: Serum macroprolactin levels in pregnancy and association with thyroid autoimmunity. *BMC Endocr Dis.* 15:31. (2015)
- 227;** P. Hausinger, I. Ungi, G. Szántó, L. Hajtman, T Forster, E. Regar, A. Thury: Intracoronary thrombus on optical coherence tomography in a patient with variant angina: treatment and follow-up. *Int J Cardiol.* 176: e32–e35. (2014)
- 228;** P. Hausinger, V. Sasi, G. Volford, M. Bitay, G. Bogáts, A. Thury, A. Palkó, T. Forster, A. Nemes: Unruptured aneurysm of the left sinus of Valsalva compressing the left main coronary artery. *Herz.* 39: 770–773. (2014)
- 229;** AA. Knowlton, AR. Lee: Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 135(1): 54–70. (2012)
- 230;** SJ. Getting, C. Di Filippo, HC. Christian, CW. Lam, F. Rossi, M. D’Amico, M. Peretti: MC-3 receptroa nd athe inflammatory mechanisms activated in acute myocardial infarct. *J Leukol Biol.* 79(4): 845-853. (2004)
- 231;** AH. Veenema, ID. Neumann: Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog Brain Res.* 170: 216-276. (2008)
- 232;** C. Strobel, S. Hunt, R. Sullivan, JY. Sun, P. Sah: Emotional regulation of pain: the role of noradrenaline in the amygdala. *Sci China Life Sci.* 57: 384–390. (2014)
- 233;** FG. Graeff, FS. Guimariies, TG. De Andrades, JF. Deakin: Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 54(I): 129-141. (1996)
- 234;** J. Ezendam, F. Staedtler, J. Pennings, RJ. Vandebriel, R. Pieters, JH Harleman, JG Vos: Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in Brown Norway rats. *Environ Health Perspect.* 112(7): 782-791. (2004)



- 235;** Y. Wang: Estrogen and testosterone in concert with EFNB3 regulate vascular smooth muscle cell contractility and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 310(7): H861-H872. (2016)
- 236;** P. Csermely: A rejtett hálózatok ereje. Vince Kiadó, Budapest 2005.
- 237;** M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola, MTD. Cronin, M. Mazura, J. Telser: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 44–84. (2007)
- 238;** S. Sueda, H. Kohno, T. Ochi, T. Uraoka, K. Tsunemitsu: Overview of the pharmacological spasm provocation test: comparisons between acetylcholine and ergonovine. *J Cardiol.* 69: 57–65. (2017)
- 239;** RC. Ferreira, T. Pereira-da-Silva, L. Patrício, H. Bezerra, M. Costa: Coronary optical coherence tomography: A practical overview of current clinical applications. *Rev Port Cardiol.* 35(2):105-112. (2016)
- 240;** A. Deswal, NJ. Petersen, AM. Feldman, JB. Young, BG. White, DL. Mann: Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation.* 103: 2055-2059. (2001)
- 241;** JK. Damas, L. Gullestad, T. Ueland, NO. Solum, S. Simonsen, SS. Froland, P. Aukrust: CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure-possible role of platelets and monocytes. *Cardiovasc Res.* 45: 428-436. (2000)
- 242;** A. Yndestad, JK. Damas, E. Oie, T. Ueland, L. Gullestad, P. Aukrust: Systemic inflammation in heart failure-the whys and wherefores. *Heart Fail Rev.* 11: 83-92. (2006)
- 243;** T. Tsutamoto, A. Wada, M. Ohnishi, T. Tsutsui, C. Ishii, K. Ohno, M. Fujii, T. Matsumoto, T. Yamamoto, T. Takayama, T. Dohke, M. Horie: Transcardiac increase in tumor necrosis factor- $\alpha$  and left ventricular end-diastolic volume in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 6: 173-180. (2004)
- 244;** T. Ueland, P. Aukrust, A. Yndestad, K. Otterdal, SS. Froland, K. Dickstein, J. Kjekshus, L. Gullestad, JK. Damas: Soluble CD40 ligand in acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 26: 1101-1107. (2005)
- 245;** RS. Shantouf, A. Mehra: Coronary fractional flow reserve. *Am J Roentgenol.* 204(3): W261-5. (2015)
- 246;** GM. Lovett, TH. Tear, DC. Evers, SEG. Findlay, BJ. Cosby, JK. Dunscomb, CT. Driscoll, KC. Weathers: Effects of air pollution on ecosystems and biological diversity in the eastern United States. *Ann NY Acad Sci.* 1162: 99–135. (2009)
- 247;** CR. China, MM. Maguta, SS. Nyandoro, A. Hilonga, SV. Kanth, KN. Njau: Alternative tanning technologies and their suitability in curbing environmental pollution from the leather industry: A comprehensive review. *Chemosphere.* 254: 126804. (2020)
- 248;** D. Giannadaki, E. Giannakis, A. Pozzer, J. Lelieveld: Estimating health and economic benefits of reductions in air pollution from agriculture. *Sci Total Environ.* 622–623: 1304–1316. (2018)
- 249;** M Wierzbicka, O. Bemowska-Kalabun, B Gworek: Multidimensional evaluation of soil pollution from railway tracks. *Ecotoxicology.* 24: 805–822. (2015)

## 12 Összefoglaló

Környezettoxikológiai szempontból jelentős hatótényezők a perzisztens szerves szennyezők (POP), ebbe a csoportba soroltak napjaink nagy környezetterhelő xenobiotikumai az aromás szénhidrogének és halogénezett származékaik. A biológiai rendszerek ezen anyagokkal, mint hatótényezőkkel elszenvedett expozíciói következtében módosulhatnak az evolúciósan fixálódott fiziológiai folyamatok. A humán populáció érintettsége kapcsán számos ritka betegség jelenik meg, vagy a már ismert kórfolyamatok lényegesen nagyobb gyakorisággal jelentkeznek. A tudomány a környezeti hatásokra megváltozó endokrin szabályozási és működési zavarokat ED funkcióként kezeli. Munkacsoportunk kutatási eredményeként korábban kiterjesztette ezt a fogalmat a hatótényezők és biológiai hatásaik vonatkozásában a homeosztatisz diszruptorok definiálásával. Jelen munkában a ClB-ok és fenilurea vegyületek ED funkcióinak vizsgálatát kívántuk elvégezni, celluláris és organizmus szintű expozíciós modellek kialakításával. Ezzel a kutatással további célként a közvetlen és/vagy közvetett ED hatások bemutatása mellett, azok perifériás folyamatokban kialakuló kardiovaszkuláris hatásaira kívántam koncentrálni. Főként a vazokonstrikcióval és az aneurizma kialakulással járó kardiovaszkuláris megbetegedésekkel összefüggésbe hozható ED kapcsolatokra fókuszáltam, amikor az orvosi gyakorlat (diagnosztika, preventív medicina, terápiatervezések) számára is jelentős környezettoxikológiai experimentális kutatásokba bekapcsolódtam. Az ED hatások tanulmányozásához a hormonális mediáció komplex folyamatrendszerének kutatásában az esszenciális hormonok (AVP, ACTH) elválasztására és a nem esszenciális, de nagyon jelentős regulációs szerepű hormonok (OT, PRL) release funkcióinak vizsgálatát tűztem ki célként. Ezen hormonokkal kapcsolatban fel kellett tárnom azokat a celluláris (érendotél és érsimaizom NO/NOS-, intracelluláris  $[Ca^{2+}]$ -, receptorfunkció-, MLCK-, apoptózis-, gyulladásos mechanizmuskaskád, vagy  $Mg^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitás stb.) és organizmus szintű csomópontokat (szociális stressz, viselkedési elemek, plazma hormonszintek stb.), amelyek a koszorúérszűkület, vagy aneurizma kialakulása szempontjából jelentősek. Így a nevezett hormonok kreatív elemként értelmezetten kerülhettek tanulmányozásra. A kreatív elemek tulajdonsága, hogy olyan mediátorként értelmezhetők, amelyek a biológiai hálózati kapcsolatokban a csomóponti szerepüket több komplexitási szinten egyszerre képesek érvényesíteni. Így vált megalapozottá kutatásainkban a monoaminok ismert komplex regulátor funkcióinak tanulmányozása, valamint a HMT vizsgálata az ED

hatás szempontjából. Ugyanakkor a monoaminok (NA, 5-HT) és HMT rendszer hormonjai (kortikoszteroidok, glükokortikoidok, ACTH) igen jelentősek kardiovaszkuláris szempontból is. A klinikum szempontjából további fontos kérdés volt annak tisztázása, hogy a CIB és fenilurea hatótényezők kiváltotta válaszmechanizmusok mennyiben térnek el egészséges, vagy beteg (zavart funkciójú) biológiai rendszerekben. Ennek megválaszolására igen alkalmasnak mutatkozott egy endokrin regulációs zavarral kiváltható betegségmodell kialakítása, amelyben a korábban nevezett hormonok release eseményei érintettek. Eredményeink nemzetközi összehasonlíthatósága és a klinikumban való hasznosítási igénye miatt, a HTP nemzetközi referencia vegyületének (dCIB) kísérletbe vonását is elvégeztük. Az ED hatások vizsgálatával párhuzamosan a kardiovaszkuláris kapcsolatok feltárását az indokolta, hogy a koszorúerspasmus világviszonylatban is igen nagy gyakoriságú megbetegedés, jelentős mortalitással. Mivel a kardiovaszkuláris betegségek gyakorisága erősen emelkedett, miközben a környezeti terhelések is dominánsan fokozódtak, így nem tekinthetünk el annak a kérdésnek a vizsgálatától, hogy lehetséges-e kapcsolat a környezeti hatótényezők szélesspektrumú jelenléte és a koszorúér betegségek fokozott jelenléte között?

Továbbá az is indokolta a kutatási célkitűzést, hogy a klinikumban alkalmazott koszorúérbetegségekre vonatkozó nemzetközi ajánlások környezeti terhelésekként csak a társadalmak szociális terheléseibe sorolt dohányzást, droghasználatot és alkoholfogyasztást említik. Napjainkban ennél sokkal karakterizáltabban, legalább a nagy hatótényezőcsoportok szerinti megjelenítésre lenne szükség. Ehhez viszont fel kell tárni a hatótényezők jelen esetben a CIB és fenilurea ágensek azon hatásmechanizmusait, amelyekkel a kutatásainkban megjelenő hatások értelmezhetőek.

A kísérleteink során a kitűzött cél az volt, hogy megvizsgáljuk *in vivo* és *in vitro* modellekben, celluláris és organizmus szintű komplexitásokban, hogy a szubtoxikus dózisu, perzisztens CIB és fenilurea vegyületek rendelkeznek-e ED hatásokkal? A kapott eredmények szerint a továbbiakban meg kívántam állapítani, hogy a vizsgált hatótényezők endokrin hatásai szerepet játszhatnak-e az vazokonstriktációs folyamatokban és az aneurizmák kialakulásában? Ezen fő kérdések megválaszolásához tematikus célkitűzési pontokat állítottam fel, amelyek vizsgálatával az experimentális munka és klinikai gyakorlat közötti kapcsolatot pontról pontra építettem fel.

Az alkalmazott módszereknél *in vitro* celluláris hormonelválasztások követése (LIA, RIA), a sejtek viabilitásának (Trypan-kék teszt) és egészséges funkcióinak /specifikus és aspecifikus release aktivitások) meghatározása,  $Mg^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitás detektálása

(módosított Martin-Dotty módszerrel), vonatkoztatási rendszerként fehérje meghatározás (módosított Lowry módszerrel) zajlott kezeletlen és hatótényezők szubtoxikus dózisaival kezelt primer monolayer sejtkultúra (NH, AdH, PRLOMA) modellek alkalmazásával. A PRLOMA sejtkultúra kialakításához *in vivo* (150 µg/ttg kg/hét) ösztrom-acetát implantációt alkalmaztam hat hónapon át, a prolaktinomas adenohipofízis jelenlétét plazma PRL szintemelkedéssel követve. Az *in vitro* modellek előzetesen *in vivo* hatótényezővel nem kezelt, vagy előzetesen CIB kezelt Wistar patkányok adenohipofíziséből készültek sterilen, enzimatikus és mechanikus disszociálással. Az *in vivo* kezelés során a biztonságos kezelési expozíciókat csecsemő gyomorszondával alakítottam ki, 0,1 - 1,0 – 10,0 µg/ttg kg/nap mCIB dózisban, 0, 30, 60, 90 napon át, táplálkozási expozíciós úton. A kezelt csoportok mellett kontroll rendszereket alkalmaztam: abszolút-, stressz-, negatív- és pozitív kontrollok bevonásával. Standardizált kísérleti protokollban *in vivo* vizsgálatokat is végeztünk, egyrészt a hormonstátusz meghatározását az AVP, OT és ACTH vonatkozásában a plazmából mérve a megfelelő időszakokban, valamint a vett vérmintákból májenzimeket is detektáltunk. Az állatok a kísérletek során folyamatosan leletezve voltak. A kísérleti csoportoknál viselkedésvizsgálatokat végeztünk OF, EPM, RI tesztekkel. A kapott eredményadatokat statisztikai analízissel (SPSS 13.0 for Windows (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA; ANOVA módszerrel és Fisher-féle LSD post hoc eljárással; Kruskal-Wallis nem-paraméteres módszerrel; Mann-Whitney U-tesztel; SAS 9.2 software segítségével (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) kezeltük.

A klinikai vizsgálatoknál koszorúerek és a szinusz Valsalva aneurizma angiográfiás vizsgálatát GE Healthcare Innova 2100 IQ Cardiovascular Imaging típusú készülékkel és 6F 3.5 Launcher (Medtronic Inc, Minneapolis, MN, USA) valamint 5F pigtail katéterrel végeztük. A FFR vizsgálat PressureWire™ Certus™ (St. Jude Medical) dróttal; a koszorúerek OCT vizsgálata Dragonfly™ katéterrel (St. Jude C7-XR konzol) történt. A koszorúerek intravaszkuláris ultrahang vizsgálata Eagle Eye® Gold katéterrel (s5™ Imaging System, Volcano Co., San Diego, CA, USA) zajlott. A koszorúereket 3,5x18mm Integrity Resolute (Medtronic Ireland) és 5x25 mm, Multi-Link Ultra (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) koronáriás sztentek beültetésével kezeltük. A szinusz Valsalva aneurizma és koszorúerek non-invazív CT angiográfiás vizsgálata GE Revolution 64 szeletes és Philips AI 256 szeletes multi detektoros spirál CT készülékekkel zajlott.

Eredményeink szerint celluláris és organizmus szinten a közvetlen hatótényező/hatás vizsgálatok ED hatásúként igazolták a dCIB, a mCIB, a PU, MU és DU

ágenseket. A monoamin aktivált (NA, 5-HT) neurohipofízis vizsgálatok eredményei (AVP és OT elválasztások) alapján nED hatásúak ezek a vegyületek. Továbbá ezen nED ágensek hatásai szoros kapcsolatot mutathatnak a koszrúerspazmus és aneurizma megjelenésével. Mindezt a homeosztázisban csomóponti szerepet játszó hormonvolumenek változásai celluláris (homon-release funkciók) és organizmus (pl. viselkedés) szinten igazolták. Az ACTH elválasztást vizsgáló HMT regulált modellben is a CIB és fenilurea vegyületek nED hatása jelent meg. A HMT működés kardiovaszkuláris vonatkozásai kapcsán az ACTH potenciális kardiovaszkuláris hatáshordozó lehet, a szív melanokortin receptorai révén. Ez akkor válik kifejezetté, ha a fiziológiásnál magasabb az ACTH koncentráció, mint pl. a kísérletesen igazolt CIB ED hatásaiban. Ekkor viszont ez a közvetlen ED hatás egy közvetett Kardiovaszkuláris Disruptor (KvD) hatásként jelenik meg. A PRL celluláris szintű regulációban közvetetten a NO/NOS rendszeren keresztül fejti ki KvD hatásait. A hipokalémiával modellezett közvetett ED hatás vizsgálatban igazolódott, hogy eltérő karakterisztikával válaszolnak az egészséges és prolaktinomás adenohipofízis sejtek az őket ért expozíció során. A zavart működésű sejtek rövidebb időszámban és nemcsak extrém alacsony  $[K^+]$  mellett mutatnak dekompenzált működést. A folyamat háttérmechanizmusaként az apoptozist igazoltuk. A közvetlen ED hatásoknál a CIB oxidatív stresszor szerepe dominál elsődlegesen. Hasonlóan ROS generálta események jelennek meg a fenilurea ágenseknél is. További felismerés, hogy az nED vegyületek KvD hatásait a ROS mechanizmuson keresztül meginduló gyulladásos folyamatok közvetlenül is kiváltják. Ekkor a ROS indukálta pl. citokin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ ) felszabadulások, a kemokinek, az érfalak permeabilitási zavarai vezetnek a következményes gyulladáshoz. De a HCIB és metabolitjai szintén a ROS mechanizmussal generálnak apoptosist és ferroptosist.

A kutatások során, a többi mintával azonos rendszerben kezelt dCIB hatásdetektálás történt, ami lehetővé tette a HTP megadását. Ezáltal a KvD hatás vonatkozásában is alkalmazható nemzetközi standardrendszerhez csatlakozhatunk a dCIB hatáskutatásával.

A CIB ágensek organizmus szintű hatásait az AVP és OT szabályozási csomópontokkal tanulmányozva szintén nED hatást igazoltunk (plazma AVP és OT koncentrációkkal és viselkedésvizsgálatokkal).

Megállapítottam a CIB és fenilurea indukálta ED hatások és KvD eseménykaskádok lehetséges kapcsolatait. A fenilureák potenciálisan érendotél diszfunkciót generálhatnak és a ROS és ROCK mechanizmusokkal és a hipoióniával

kapcsolt folyamatokban is érintettek lehetnek miközben az nED hatást prezentálják. A ClB vegyületek szorongás, agresszió, AVP, OT, ACTH, PRL szabályozást zavarják, a ROS és gyulladásos folyamatokat indukálják, valamint a simaizomsejt apoptozist és ferroptozist generálnak.

A disszertáció experimentális és klinikai eredményei kijelölték számomra a további kutatási célterületeket, amelyek során közvetlenül szeretném igazolni a feltárt, kardiovaszkuláris jelentőséggel bíró celluláris és organizmus szintű csomópontokban érvényesülő dClB, mClB, PU, MU, DU hatásokat.

## 13 Summary

Persistent organic pollutants (POPs) are significant factors in terms of environmental toxicology. Aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives as important environmental xenobiotics are classified as POPs. Exposures of biological systems to these substances may alter evolutionarily fixed physiological processes. A number of yet unknown rare diseases may occur or already known diseases may appear with a significantly higher frequency as a result of exposure of the human population. Endocrine regulatory and functional changes in response to environmental effects are scientifically interpreted as endocrine disruptor (ED) functions. Our research group has previously extended this concept by defining homeostatic disruptors with respect to these environmental factors and their biological effects. In the present work, we aimed to investigate the ED functions of chlorobenzenes (ClBs) and phenylurea compounds by setting up cellular and organism-level exposure models. In addition to presenting direct and/or indirect ED effects of these agents, we also aimed to focus on their cardiovascular effects in peripheral processes. Thus, potential ED relationships associated with development of vasospasms and aneurysms were investigated primarily, which has great relevance to medical practice (diagnostics, preventive medicine, therapy planning). To study the ED effects in the complex process of hormonal mediation, we aimed to focus on the secretion of essential hormones (AVP, ACTH) and the release functions of non-essential but important regulatory hormones (OT, PRL) and their cellular- (vascular endothelial and vascular smooth muscle NO/NOS, intracellular  $[Ca^{2+}]$ , receptor functions, MLCK, apoptosis, inflammatory mechanism cascade, or  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activity etc.) and organism-level mechanisms (social stress, behavioral elements, plasma hormone levels etc.) that may underlie coronary spasms or aneurysms. The hormones discussed above could be studied as creative elements. By definition, creative elements can be interpreted as mediators that are simultaneously able to assert their nodal role in biological networks at several levels of complexity. The study of ED effects on the known complex regulatory functions of monoamines and the hypophyseal-adrenal axis is, thus, reasonable. However, monoamines (NA, 5-HT) and hormones of the hypophyseal-adrenal axis (corticosteroids, glucocorticoids, ACTH) are also of great importance from a cardiovascular point of view. Another important issue for clinical consideration was to clarify the extent to which the response mechanisms elicited by ClBs and phenylurea agents differ in healthy or diseased (dysfunctional) biological systems.

To answer this, setting up a disease model triggered by endocrine dysregulation involving the release of previously mentioned hormones proved to be suitable. Because of the need for international comparability and clinical application of our results, the international reference compound 1,4-dichlorobenzene (dCIB) of human toxicity potential (HTP) was also included in the experiment. Besides examining the ED effects, the exploration of cardiovascular aspects was justified by the fact that coronary spasm is a common disease worldwide, with significant mortality. Since the incidence of coronary heart diseases has sharply increased together with the growing presence of environmental toxicological burdens, a possible relationship between coronary diseases and environmental factors can be reasonably suspected. In contrast to this, the international recommendations for management of coronary heart diseases only mention smoking, drug use and alcohol consumption as environmental burdens in societies. Nowadays, characterization of at least larger groups of environmental factors in this aspect is imperative. For this reason, it is necessary to explore the mechanisms of action of CIBs and phenylurea agents. Therefore, we aimed to examine the ED effects of subtoxic-doses of persistent CIBs and phenylurea compounds in complexities at cellular- and organism level in both *in vivo* and *in vitro* models. We also intended to determine whether the endocrine effects of the investigated factors may play a role in vasoconstrictive processes and aneurysm formation. Thematic objective points were set up in order to answer these questions, establishing a connection between experimental work and clinical practice point by point. Monitoring of *in vitro* cellular hormone secretions (LIA, RIA), determination of specific (Trypan-blue test) and non-specific (release activities) cell viability and healthy functions, detection of  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activity (modified Martin-Dotty method) was achieved. *In vivo* (150  $\mu$ g / bw. kg / week) estrone-acetate implantation was used for six months to produce prolactinoma adenohypophysis cell cultures (PRLOMA) cell culture. Determination of total protein content (modified Lowry method) was performed as a reference system using primary monolayer cell culture (neurohypophysis (NH), adenohypophysis (AdH), PRLOMA cell cultures) models untreated or treated with subtoxic doses of test agents. Prolactinoma transformation of adenohypophysis was confirmed by monitoring of elevated PRL levels. *In vitro* models were prepared from the adenohypophyses of untreated or *in vivo* CIBs pretreated Wistar rats by sterile, enzymatic and mechanical dissociation. *In vivo* 0.1 - 1.0 - 10.0  $\mu$ g / bw. kg / day mix of CIBs (mCIB) exposures were applied via infant gastric tube for 0, 30, 60, 90 days. In addition to the treated groups, absolute, stress, negative and positive control groups were set up.



Standardized *in vivo* studies were also performed by measurement of plasma AVP, OT and ACTH hormone and liver enzyme levels obtained within appropriate time intervals. The experimental animals were medically certified throughout the experiment. Treatment groups participated in behavioral tests (open field, elevated plus maze and resident intruder tests). Statistical analyses were carried out using ANOVA, Fisher's LSD post hoc test, Kruskal-Wallis non-parametric method, Mann-Whitney U-test and with SPSS 13.0 for Windows (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA) and SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) softwares.

In clinical studies, GE Healthcare Innova 2100 IQ Cardiovascular Imaging equipment was used for angiographic assessment of coronary arteries and sinus Valsalva aneurysm. 6F 3.5 JL Launcher (Medtronic Inc, Minneapolis, MN, USA) and 5F pigtail catheters were used for angiographic procedures. FFR measurements were performed using PressureWire™ Certus™ (St. Jude Medical), Dragonfly™ catheter (St. Jude C7-XR console) was utilized for OCT imaging, Eagle Eye® Gold catheter (s5™ Imaging System, Volcano Co., San Diego, CA, USA) was applied for IVUS imaging. For percutaneous coronary intervention 3,5x18mm Integrity Resolute (Medtronic Ireland) and 5x25 mm, Multi-Link Ultra (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) stents were used. CT angiographic study for non-invasive follow up of sinus Valsalva aneurysm and coronary arteries was performed by GE Revolution 64 multi-slice CT and Philips AI 256 multi-slice CT equipments.

Our results confirmed the ED effects of dCIB, mCIB, phenuron (PU), monuron (MU) and diuron (DU) both at cellular and organism levels. The neuroendocrine disruptor (nED) effects of these compounds were also proven based on the results of monoamine activated (NA, 5-HT) neurohypophysis (AVP and OT) studies. Furthermore, the effects of these nED agents may be closely related to development of coronary spasms and aneurysms. All this was confirmed by the changes in hormone volumes that play nodal role in homeostasis at both cellular- (hormone-release functions) and organism (e.g. behavioral) levels. The nED effect of CIBs and phenylurea compounds was also detected in the hypophyseal-adrenal axis regulated model studying ACTH secretion. Regarding the cardiovascular aspects of hypophyseal-adrenal axis function, ACTH may be a potential cardiovascular mediator through cardiac melanocortin receptors. This may manifest at ACTH concentrations exceeding physiological levels, e.g. experimentally confirmed ED effect of CIBs. In turn, this direct ED effect results in an indirect Cardiovascular Disruptor (KvD) effect. PRL exerts its KvD effects indirectly through the NO/NOS system in

cellular regulation. An indirect ED effect study modelled with hypokalaemia demonstrated that healthy and prolactinoma adenohypophyseal cells respond with different characteristics during exposure. Disrupted cells show decompensated function in a shorter time interval and not only at extremely low  $[K^+]$ . Apoptosis was confirmed as the background mechanism of this process. In the case of direct ED effects, the oxidative stressor role of ClBs predominates. Similarly, ROS-generated events appear with phenylurea agents as well. It is further recognized that the KvD effects of nEDs are directly triggered by inflammatory processes initiated through the ROS mechanism. In this case, ROS induced e.g. cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ ), chemokines and vascular wall permeability disorders lead to consequent inflammation. Hexachlorobenzene and its metabolites also generate apoptosis and ferroptosis by the ROS mechanism. The effect of dClB applied in the same system was also examined in the research. This allowed for the determination of HTP so as to join the international standardized system that can be applied to the KvD as well. We also demonstrated the nED effect of ClBs at organism level (with plasma AVP and OT concentrations and behavioral tests). We established possible relationships between ClB and phenylurea-induced ED effects and KvD event cascades. Phenylureas may generate vascular endothelial dysfunction through ROS and ROCK mechanisms and may be involved in hypoionia-related processes presenting nED effect. ClBs interfere with anxiety, aggression, AVP, OT, ACTH, PRL regulation, induce ROS and inflammatory processes, and generate smooth muscle cell apoptosis and ferroptosis. The experimental and clinical results of the dissertation assigned me further research areas, such as directly proving the KvD effects of dClB, mClB, PU, MU, DU at cellular and organism level.